

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E
NEUROINFLAMAÇÃO: BUSCA POR
BIOMARCADORES E ALVOS TERAPÊUTICOS**

TESE DE DOUTORADO

JOSEMAR MARCHEZAN

Porto Alegre, Brasil

2018

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

**TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E
NEUROINFLAMAÇÃO: BUSCA POR
BIOMARCADORES E ALVOS TERAPÊUTICOS**

JOSEMAR MARCHEZAN

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Carmem Gottfried

Porto Alegre, Brasil

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Marchezan, Josemar

TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E NEUROINFLAMAÇÃO:
BUSCA POR BIOMARCADORES E ALVOS TERAPÊUTICOS /
Josemar Marchezan. -- 2018.

255 f.

Orientador: Rudimar dos Santos Riesgo.

Coorientadora: Carmem Gottfried.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Sistema Imune. 3. Resveratrol. 4. MicroRNA. I. dos Santos Riesgo, Rudimar, orient. II. Gottfried, Carmem, coorient. III. Título.

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

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

17/07/2018

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Lauro José Gregianini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a. Josiane Ranzan

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof^a. Dr^a. Clarissa Aires Roza

Universidade de Santa Cruz / Universidade do Vale do Taquari

*Para minha mãe, Salete Cocco Marchezan,
com gratidão e saudade.*

AGRADECIMENTOS

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

A minha coorientadora Prof^a. Carmem Gottfried, exemplo de vida dedicada à ciência, sem a qual esse projeto não teria existido, agradeço a amizade, as orientações e o apoio constante.

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

Aos colegas de pós-graduação Iohanna Deckmann, Mauro Mozael Hirsch, Mellanie Fontes-Dutra, Guilherme Cordenonsi da Fonseca e Victorio Bambini-Junior pela receptividade, amizade e toda ajuda prestada.

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

A minha esposa Luiza, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

A minha filha Cecília, por tornar os dias de muito trabalho mais alegres.

Aos alunos de iniciação científica Giovanna Carello Collar e Eduardo Geyer Arrussul Winkler dos Santos pela colaboração no projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, professores e funcionários, pelos ensinamentos e oportunidades. Especialmente a Rosane Blanguer, sempre eficiente e prestativa.

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

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

RESUMO

Introdução: O diagnóstico do transtorno do espectro autista (TEA) permanece clínico. A disfunção imunológica tem sido uma característica reconhecida no TEA e diversos pesquisadores sugerem que possa ser utilizada como ferramenta diagnóstica na forma de biomarcador além de uma via efetiva para intervenção farmacológica. MicroRNA referem-se a um grupo de pequenos RNA não-codificantes e seu uso como biomarcadores tem recebido atenção progressiva. O resveratrol (RSV) apresenta capacidade de modulação da resposta inflamatória e estudos em animais têm indicado seu efeito benéfico nos sintomas do TEA.

Objetivo: Avaliar os efeitos da administração de RSV a sujeitos pediátricos com TEA no comportamento, expressão de microRNA, além de sua segurança. Adicionalmente, avaliar a expressão de microRNA na saliva de crianças com TEA e controles. **Metodologia:** Foi administrado RSV 200mg ao dia para 5 crianças pelo período de 90 dias. Avaliou-se as escalas *Clinical Global Impressions-Improvement* (CGI-I) e *Aberrant Behavior Checklist* (ABC), expressão de microRNA e exames laboratoriais previamente e após o tratamento. Também foi avaliada a expressão de microRNA na saliva de 26 crianças com TEA e respectivos controles.

Resultados: Houve redução significativa nos escores da escala ABC total ($p=0,042$) e da subescala Irritabilidade ($p=0,041$). As subescalas Comportamento estereotipado ($p=0,066$), Hiperatividade ($p=0,068$) e Letargia e esquiva social ($p=0,078$) tiveram redução limítrofe para significância. Pela escala CGI-I, três (60%) dos cinco participantes estavam melhor, 1 ligeiramente melhor e 1 não apresentou alterações. Não houve efeitos adversos, nem variações laboratoriais associados ao uso do RSV. Dos 8 microRNA avaliados, houve diferença de expressão pré e pós resveratrol dos miRNA: miR-124-3p, miR-125a-5p e miR-195-5p. Na avaliação a expressão de microRNA foi possível verificar o aumento de expressão do miR-191 nos pacientes com TEA em relação aos controles. **Conclusões:** Os resultados deste estudo sugerem a segurança do uso de RSV em crianças e seu possível efeito benéfico nos sintomas do espectro. O RSV também aumentou a expressão dos miR-124, miR-125a-5p e miR-195-5p. Nas amostras de saliva, encontramos aumento de expressão do miR-191 nos pacientes com TEA. Novos ensaios clínicos controlados por placebo são necessários para confirmar o potencial terapêutico e a segurança do RSV em crianças com TEA. A continuidade de pesquisas para avaliar os miRNA como biomarcadores e alvos terapêuticos no TEA também é encorajada.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista. TEA. Disfunção imune. Resveratrol. MicroRNA.

ABSTRACT

Introduction: Diagnosis of autism spectrum disorder (ASD) is purely clinical. Immune dysfunction is a well-known phenomenon in ASD, and several research groups have suggested that it may be employed as a diagnostic tool acting as a biomarker, as well as a therapeutic target suitable for pharmacologic intervention. MicroRNAs are small non-coding RNAs, and their use as biomarkers have received widespread attention. O Resveratrol (RSV) demonstrates the ability of modulating inflammatory responses, and animal studies suggest that its use may be beneficial in treating ASD symptoms. **Objectives:** To evaluate the safety of administering RSV in pediatric patients diagnosed with ASD, as well as to evaluate the effects of RSV in their behavior and microRNA expression. Additionally, to analyze microRNA expression in the saliva of patients diagnosed with ASD and compare it to healthy controls. **Methods:** Five children diagnosed with ASD received 200mg RSV daily, for 90 days. The patients were evaluated via the Clinical Global Impressions-Improvement (CGI-I) and Aberrant Behavior Checklist (ABC) scale, microRNA expression, and clinical laboratory exams before and after treatment. The expression of microRNA in the saliva of 26 children diagnosed with ASD, as well as in age-matched controls, was also analyzed. **Results:** The total score of the ABC scale and Irritability subscale score were significantly reduced ($P = 0.042$ and $P = 0.041$, respectively). The Stereotypy ($P = 0.066$), Hyperactivity ($P = 0.068$), and Lethargy/Social Withdrawal ($P = 0.078$) subscales were also reduced, albeit not significantly. According to the CGI-I scale, three (60%) of the five patients demonstrated improvement, one patient demonstrated slight improvement and one patient did not demonstrate changes in behavior. There were no adverse effects and laboratory test results remained unchanged after RSV use. Of the eight microRNAs evaluated, differences in expression before and after RSV treatment was observed in miR-124-3p, miR-125a-5p and miR-195-5p. miR-191 was overexpressed in the saliva of patients diagnosed with ASD, in comparison to their age-matched controls. **Conclusion:** These results demonstrate that RSV is safe for use in the pediatric population, and that it may be beneficial in relieving ASD symptoms. RSV also increased the expression of miR-124, miR-125a-5p and miR-195-5p. In saliva samples, we found that miR-191 expression was increased in patients diagnosed with ASD. New placebo-controlled clinical trials are necessary to confirm RSV's therapeutic potential and safety in children diagnosed with ASD. The ongoing research to evaluate miRNAs as biomarkers and therapeutic targets is also encouraged.

Keywords: Autism spectrum disorder. ASD. Immune dysfunction. Resveratrol. MicroRNA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Índice de Preferência Social.	47
Figura 2 - Tempo de interação social.	48
Figura 3 - Biogênese dos miRNA.	50
Figura 4 - Rede/relações entre miRNA	51
Figura 5 - Mecanismo de transporte de moléculas do plasma para os ductos salivares.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Achados pós-natais no sistema imune periférico de crianças com TEA.....	32
Tabela 2 - Citocinas e associação com severidade dos sintomas relacionados ao TEA.	33
Tabela 3 - Genes alterados em TEA e correlacionados com função imune.....	35
Tabela 4 - Citocinas alteradas no TEA.....	37
Tabela 5 - Doses e efeitos colaterais em ensaios clínicos com resveratrol.	45
Tabela 6 - MicroRNA com expressão alterada em sujeitos com TEA.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	<i>Applied Behavior Analysis</i>
ABC	<i>Aberrant Behavior Checklist</i>
ADI-R	<i>Autism Diagnostic Interview-Revised</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
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>
CNV	Variação no número de cópias
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CPC	Centro de Pesquisas Clínicas
DSM-5	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition</i>
DSM-III	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition</i>
DSM-III-R	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition-Revised</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Floortime	<i>Developmental Individual Difference Relations-Ship-Based Approach</i>
GAF	<i>Assesment Functioning Scale</i>
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MCP	Proteína de quimioatração de monócitos
MCP-1	Proteína quimioatratante para monócitos 1

miRNA	MicroRNA
MSEL	<i>Mullen Scales of Early Learning</i>
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PECS	<i>Picture Exchange Communication System</i>
PET	Tomografia com emissão de pósitrons
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog gene</i>
QI	Quociente de Inteligência
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNAm	RNA mensageiro
RSV	Resveratrol
SSRI	Inibidores seletivos da recaptção da serotonina
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TEACCH	<i>Treatment and Educational of Autistic and Related Communication-Handicapped Children Children</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOC	Transtorno Obsessivo-Compulsivo
Treg	Célula T reguladora
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VABS	<i>Vineland Adaptive Behavior Scales</i>
VPA	Ácido valproico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	20
2.1.1 Aspectos Históricos.....	20
2.1.2 Aspectos epidemiológicos	21
2.1.3 Manifestações clínicas e diagnóstico	22
2.1.4 Etiologia e Neurobiologia.....	24
2.1.5 Tratamento.....	27
2.1.6 Prognóstico	29
2.2 TEA E O SISTEMA IMUNOLÓGICO	29
2.3 RESVERATROL	40
2.3.1 Biodisponibilidade e farmacocinética em humanos	41
2.3.2 Estudos de toxicidade do RSV em animais	43
2.3.3 Resveratrol e estudos em humanos	43
2.3.4 Resveratrol: efeito neuroprotetor e anti-inflamatório	43
2.3.5 Resveratrol e Transtorno do Espectro Autista	44
2.4 MICRORNA.....	49
2.4.1 MicroRNA e TEA	51
2.4.2 MicroRNA e Biomarcadores	52
2.4.3 Expressão de MicroRNA na saliva	55
3 JUSTIFICATIVA	57
4 OBJETIVOS RELACIONADOS AO ARTIGO 2: USO DE RESVERATROL EM SUJEITOS DE PESQUISA PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	58
4.1 OBEJTIVO GERAL.....	58

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
5 METODOLOGIA RELACIONADA AO ARTIGO 2: USO DE RESVERATROL EM SUJEITOS DE PESQUISA PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.....	58
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	58
5.2 AMOSTRA.....	59
5.2.1 Critérios de Inclusão	59
5.2.2 Critérios de Exclusão	59
5.3 INTERVENÇÃO.....	60
5.4 VARIÁVEIS EM ESTUDO	60
5.5 DESFECHO ESPERADO.....	61
5.6 FERRAMENTAS DE PESQUISA	61
5.7 EXTRAÇÃO DE MICRORNA	62
5.8 LOCAL DE REALIZAÇÃO	66
5.9 LOGÍSTICA	66
5.10 ASPECTOS ESTATÍSTICOS.....	67
5.10.1 Cálculo do tamanho da amostra	67
5.10.2 Análise dos resultados	67
5.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	68
6 OBJETIVOS RELACIONADOS AO ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNA EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	69
6.1 OBEJTIVO GERAL.....	69
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
7 METODOLOGIA RELACIONADA AO ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNA EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	69
7.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	69

7.2 AMOSTRA.....	70
7.2.1 Critérios de Inclusão	70
7.2.2 Critérios de Exclusão	70
7.3 VARIÁVEIS EM ESTUDO.....	71
7.4 DESFECHO ESPERADO.....	71
7.5 LOCAL DE REALIZAÇÃO.....	71
7.6 LOGÍSTICA.....	71
7.6.1 Coleta de saliva e análise de microRNA	72
7.7 ASPECTOS ESTATÍSTICOS.....	73
7.7.1 Cálculo do tamanho da amostra	74
7.7.2 Análise dos resultados	74
7.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	74
8 REFERÊNCIAS	75
9 ARTIGO 1 PORTUGUÊS	93
10 ARTIGO 1 INGLÊS	140
11 ARTIGO 2 PORTUGUÊS	184
12 ARTIGO 2 INGLÊS	204
13 ARTIGO 3 PORTUGUÊS	224
14 ARTIGO 3 INGLÊS	234
15 CONSIDERAÇÕES FINAIS	244
APÊNDICES	246
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – VOLUNTÁRIOS PARA USO DE RESVERATROL.....	246
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNA – CASOS.....	248
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNA - CONTROLES.....	250
ANEXOS	252

ANEXO A – Critérios diagnósticos para Transtorno do Espectro Autista segundo o DSM-5.	252
ANEXO B – Escala <i>Clinical Global Impression</i> (CGI).....	253
ANEXO C - <i>Aberrant Behavior Checklist</i> (ABC)	254

1 INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio do desenvolvimento neurológico de base biológica caracterizado por alterações em dois domínios comportamentais principais: 1) déficits na comunicação e interação sociais e 2) padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades (ASSOCIATION, 2013).

O diagnóstico de TEA aumentou dramaticamente nas últimas décadas. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention* - CDC) estimou em 2018 a prevalência de TEA em 16,8 por 1000 crianças (1 em 59) com idade de 8 anos, afetando 26,6/1000 meninos e 6,6/1000 meninas (BAIO *et al.*, 2018). Essa prevalência representa um aumento de aproximadamente 150% entre os anos 2000 e 2014 (BAIO *et al.*, 2018). A expansão dos critérios diagnósticos pode explicar em parte esses valores, mas não justifica todo o aumento registrado. Esses números evidenciam o TEA como uma das desordens do neurodesenvolvimento mais frequentes, representando uma grande preocupação em saúde pública (BAXTER *et al.*, 2015; BRENTANI *et al.*, 2013).

Um dos aspectos mais desconcertantes do TEA continua sendo sua etiologia. As causas suspeitas do TEA são tão diversas quanto o próprio espectro, e presumivelmente refletem o ambiente intrauterino, o início da vida da criança e herança genética (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Evidências acumuladas até o momento sugerem que fatores genéticos, ambientais, inflamatórios, imunológicos e metabólicos desempenham um papel proeminente no distúrbio (BORIS *et al.*, 2007; GHALEIHA *et al.*, 2015).

A disfunção imunológica tem sido uma característica reconhecida TEA há várias décadas e tem sido destacada em revisões recentes (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014). Nos últimos anos, estudos em modelos animais e humanos mostraram evidências de alterações no sistema imunológico central e periférico no TEA, incluindo alterações na estimulação de células do sistema imunológico, geração de auto-anticorpos, desequilíbrio de citocinas/quimiocinas e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*,

2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

Na ausência de um marcador biológico, o diagnóstico do autismo e a demarcação dos seus limites permanecem uma decisão clínica (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; GOLDANI *et al.*, 2014; SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018). Numerosos biomarcadores têm sido propostos para o TEA, incluindo marcadores bioquímicos, morfológicos, imunológicos, hormonais, neurofisiológicos, neuroanatômicos e neuropsicológicos (AHMAD *et al.*, 2017; FULCERI *et al.*, 2018; HEUNIS; ALDRICH; DE VRIES, 2016; INGA JÁCOME *et al.*, 2016; LI; KARNATH; XU, 2017; MASI *et al.*, 2017; RUGGERI *et al.*, 2014).

Os MicroRNA (miRNA) referem-se a um grupo de pequenos RNA não-codificantes (CHEN; RAJEWSKY, 2007), com notável estabilidade e resistência à degradação (KICHUKOVA *et al.*, 2017), que podem atuar como reguladores de diversos processos. Os miRNA estão envolvidos em múltiplos estágios do desenvolvimento do cérebro e manutenção da função do sistema nervoso central (SNC) ao longo da idade adulta (BELZEAUX; LIN; TURECKI, 2017; BLANDFORD; GALLOWAY; MOORE, 2018) além de resposta imunes em condições patológicas e fisiológicas (SUN *et al.*, 2018). O uso de perfis de miRNA como biomarcadores para patologias do SNC tem recebido atenção significativa nos últimos anos (BLANDFORD; GALLOWAY; MOORE, 2018; MELLIOS; SUR, 2012). Os biomarcadores poderiam auxiliar no diagnóstico precoce, na mensuração de risco de desenvolvimento do TEA, no prognóstico, na caracterização de subgrupos de pacientes e na definição de subconjuntos de indivíduos que responderiam mais favoravelmente a tratamentos específicos (ANDERSON, 2015; BELZEAUX; LIN; TURECKI, 2017; GOLDANI *et al.*, 2014; ZWAIGENBAUM; PENNER, 2018).

Atualmente, não existem medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratar os sintomas nucleares do autismo, sendo a farmacoterapia utilizada somente para melhorar os sintomas associados ao transtorno, tais como hiperatividade, impulsividade, desatenção, agressividade, irritabilidade e ansiedade (KAPLAN; MCCRACKEN, 2012; LECLERC; EASLEY, 2015; MARCUS *et al.*, 2009; MEAD; ASHWOOD, 2015; OWEN *et al.*, 2009; TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Esses agentes, contudo, têm eficácia limitada e desencadeiam importantes efeitos adversos (WINK *et al.*, 2010). O tratamento com o antipsicótico Risperidona por exemplo, aumenta o risco de sobrepeso e de obesidade (HOEKSTRA *et al.*, 2010).

Muitos pesquisadores sugerem a possibilidade de que a disfunção imune no TEA possa ser caminho viável para a intervenção farmacológica, e um subgrupo de indivíduos com TEA poderia se beneficiar de terapias de base imunológica. (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; ESTES; MCALLISTER, 2015; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; LACIVITA *et al.*, 2017; MCDUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; MELTZER; VAN DE WATER, 2017; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

O Resveratrol (RSV) é uma molécula simples inicialmente isolada em extrato derivado da planta *Cassia quinquangulata* (JANG *et al.*, 1997) e apresenta capacidade de modulação da resposta inflamatória. Estudos em animais têm indicado seu efeito neuroprotetor (QUINCOZES-SANTOS; GOTTFRIED, 2011; VANG *et al.*, 2011). No modelo animal de autismo induzido por exposição pre-natal ao ácido valproico, o RSV preveniu sintomas comportamentais típicos do TEA (BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2014; FONTES-DUTRA *et al.*, 2018; HIRSCH *et al.*, 2018). O seu papel antiinflamatório e antioxidante pode estar modulando e prevenindo uma desregulação imune na prole desde o período gestacional (AHMAD *et al.*, 2018a, 2018b; BAKHEET *et al.*, 2017; BHANDARI; KUHAD, 2017).

O prejuízo individual causado pelo TEA afeta várias faces do funcionamento diário e, muitas vezes, impede a independência na vida adulta (MASI *et al.*, 2017). O substancial efeito econômico direto e indireto dos tratamentos e o sofrimento do indivíduo e de sua família reforçam a necessidade da busca contínua por intervenções efetivas (BUESCHER *et al.*, 2014; KARST; VAN HECKE, 2012; MARCHEZAN *et al.*, 2017; SMITH; GREENBERG; MAILICK, 2014; WEISS *et al.*, 2012).

Neste trabalho, foi realizada a administração resveratrol a sujeitos pediátricos com TEA para avaliação de seus efeitos no comportamento, microRNA, além de sua tolerabilidade e segurança. Adicionalmente, avaliou-se a expressão de microRNA na saliva de crianças com TEA e controles.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

2.1.1 Aspectos Históricos

A expressão “autismo” foi primeiramente utilizada em 1911 pelo psiquiatra suíço Eugen Bleurer para designar a perda de contato com a realidade (“uma retirada definitiva do mundo externo”), o que considerava um dos principais sintomas da esquizofrenia, termo também de sua autoria (VERHOEFF, 2013). No entanto, foi o psiquiatra infantil Leo Kanner (KANNER, 1968), a partir de uma amostra de 11 crianças com condutas não esclarecidas por nenhum sistema nosológico, quem descreveu pela primeira vez o autismo como uma síndrome comportamental caracterizada por alterações na linguagem ou na comunicação, nos relacionamentos sociais e na capacidade cognitiva (GREYDANUS; TOLEDO-PEREYRA, 2012). Kanner também observou respostas incomuns ao ambiente, que incluíam maneirismos motores estereotipados, resistência a mudanças ou insistência na monotonia (KANNER, 1968).

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

Em 1980 essas linhas convergentes de investigação levaram à inclusão do "Autismo Infantil" como um diagnóstico oficialmente reconhecido no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition* (DSM-III) (VOLKMAR; MCPARTLAND, 2014). No ano de 1987, o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition-Revised* (DSM-III-R) instituiu critérios diagnósticos com uma perspectiva de desenvolvimento, e foram estabelecidos dois diagnósticos, encampados sob o termo Transtornos Invasivos (ou Globais) do Desenvolvimento: (1) Autismo; e (2) Transtorno Invasivo (ou Global) do Desenvolvimento não especificado. Em 1994 o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition* (DSM-IV), na tentativa de equilibrar a sensibilidade e especificidade da abordagem diagnóstica, criou 5 subgrupos dentro dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento: Autismo, Síndrome de Rett, Transtorno Desintegrativo da Infância, Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Não-Especificado e Síndrome de Asperger (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; GOTTFRIED *et al.*, 2015; TCHACONAS; ADESMAN, 2013). No início do ano de 2013, foi publicado nos Estados Unidos o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition* (DSM-5), que optou por juntar todos os subgrupos sob o termo comum de TEA e classificá-los conforme a intensidade dos sintomas em leve, moderado e grave. O DSM-5 excluiu do grupo o Transtorno de Rett e o Transtorno Desintegrativo da Infância por serem distúrbios neurológicos com etiologia distinta (ASSOCIATION, 2013; VERHOEFF, 2013).

2.1.2 Aspectos epidemiológicos

Quando foi inicialmente descrito em 1942 (KANNER, 1968), o autismo era mencionado como uma condição rara, afetando não mais que 4 crianças por 100.000. O primeiro estudo epidemiológico sobre o autismo foi realizado apenas em 1966, por Victor Lotter (BRENTANI *et al.*, 2013). Nesse estudo, ele relatou uma prevalência de 4,5 em 10.000 em toda a população de crianças de 8 a 10 anos de Middlesex, um condado ao noroeste de Londres.

A prevalência estimada na década de 1980-1990 era de 4-5/10.000 habitantes. Na década 1990-2000, aumentou para 30-60/10.000. Atualmente, acredita-se que o TEA afete cerca de 1% da população (SIMONOFF, 2012), e dados de estudos na Ásia, Europa e América do Norte confirmam essa prevalência (NORIEGA; SAVELKOUL, 2014). Em 2018, o *Center*

for Disease Control and Prevention (CDC) estimou a prevalência de TEA em 16,8 por 1000 crianças (1 em 59) com idade de 8 anos, afetando 26,6/1000 meninos e 6,6/1000 meninas (BAIO *et al.*, 2018). Essa prevalência representa um aumento de aproximadamente 150% entre os anos 2000 e 2014 (BAIO *et al.*, 2018). A idade de 8 anos foi escolhida pelo CDC por ser o pico de prevalência do transtorno.

Estudos epidemiológicos evidenciam uma maior incidência de autismo em meninos do que em meninas, com proporções médias relatadas de 3,5 a 4,0 meninos para cada menina. Essa preponderância ainda não é bem entendida, e fatores genéticos, epigenéticos, hormonais, imunes e ambientais estariam implicados (BAIO *et al.*, 2018; FERRI; ABEL; BRODKIN, 2018; SCHAAFSMA; PFAFF, 2014). A proporção do sexo masculino para feminino é ainda mais acentuada em indivíduos com nível intelectual mais elevado, para cerca de 11:1 (GILLBERG *et al.*, 2006).

Atualmente há mais diagnósticos de autismo em crianças a cada ano nos Estados Unidos da América (EUA) do que AIDS, câncer e diabetes combinados (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). A prevalência do TEA o torna uma das desordens do desenvolvimento neurológico mais frequentes, representando uma grande preocupação de saúde pública (BRENTANI *et al.*, 2013) e levando a altos custos sociais e econômicos. O custo do suporte a um indivíduo com TEA e deficiência mental durante a sua vida foi avaliada em 2,4 milhões de dólares nos EUA e 2,2 milhões de dólares no Reino Unido. Os maiores componentes dessas despesas na infância foram os serviços de educação especial e perda de produtividade dos pais (BUESCHER *et al.*, 2014).

Provavelmente o aumento da incidência do TEA seja devido à combinação de diferentes fatores, principalmente ao aumento do reconhecimento da patologia e à detecção precoce por pediatras e professores, além da ampliação do conceito de autismo com inclusão de fenótipos mais diversos. Nesse último se inclui a "aposição de diagnósticos", em que pacientes com outros diagnósticos prévios, como retardo mental, adicionalmente possuem critérios para também receber o diagnóstico de autismo. Outros fatores como idade materna e paterna avançada e o potencial efeito de toxinas ambientais estão sob investigação (PARELLADA *et al.*, 2014).

2.1.3 Manifestações clínicas e diagnóstico

O TEA é um distúrbio que se manifesta por uma grande variedade de sintomas nas áreas cognitiva, emocional e neurocomportamental. Apesar das características que o compõem serem bem definidas, a grande heterogeneidade dos achados em cada indivíduo torna o seu reconhecimento desafiador. O transtorno engloba fenótipos extremamente heterogêneos, principalmente nos casos mais brandos do espectro, e a gravidade dos déficits centrais varia grandemente entre os pacientes (JOHNSON; MYERS; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COUNCIL ON CHILDREN WITH DISABILITIES, 2007; SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018; STANKOVIC; LAKIC; ILIC, 2012).

Os principais sintomas do espectro são déficits de interação social, déficits de comunicação e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades; juntos, constituem a conhecida tríade diagnóstica de Wing. Embora esses sintomas possam ocorrer em uma variedade de transtornos psiquiátricos, é a junção deles em um mesmo indivíduo que torna o TEA único. Os sintomas também variam com a idade. Durante a infância, as crianças com autismo costumam apresentar mais déficits de linguagem e agitação. Já na adolescência, os sintomas mais importantes podem ser os problemas de relacionamento e de modulação do humor (NAZEER; GHAZIUDDIN, 2012; SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018).

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

Hiperatividade, auto e heteroagressividade ocorrem em mais da metade dessas crianças. Comportamentos auto-agressivos são mais comuns entre pacientes com deficiência cognitiva, e os gatilhos para esses comportamentos podem ser previsíveis (frustração, ansiedade, excitação) ou aparentemente aleatórias. A falta de compreensão ou a incapacidade de se comunicar, ou a frustração total, podem levar a explosões de agressividade (KLIN, 2006).

Na ausência de um marcador biológico, o diagnóstico do autismo e a demarcação dos seus limites permanecem uma decisão clínica (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; GOLDANI *et al.*, 2014; SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018). Instrumentos e escalas são frequentemente utilizados para auxílio diagnóstico do transtorno, e esses instrumentos de avaliação incluem entrevistas com pais/cuidadores, entrevistas com pacientes, observação

direta de pacientes e avaliações que englobam uma revisão completa da história familiar para TEA ou outros distúrbios do neurodesenvolvimento (SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018).

No DSM-5, "Transtorno do Espectro Autista" é o termo que substitui todas as subclassificações anteriormente utilizados no DSM IV-TR. A eliminação de transtorno de Asperger no DSM-5 tem sido compreensivelmente controverso, com dados na literatura que prestam serviços a retirada e também à manutenção do subtipo categórico (KING *et al.*, 2014). O diagnóstico precoce alivia as preocupações prolongadas de muitas famílias e acelera oportunidades de beneficiar a criança com intervenções especializadas (ANAGNOSTOU *et al.*, 2014). Os critérios diagnósticos conforme o DSM-5 encontram-se no Anexo A.

Numerosos biomarcadores têm sido propostos para o TEA, incluindo marcadores bioquímicos, morfológicos, imunológicos, hormonais, neurofisiológicos, neuroanatômicos e neuropsicológicos (AHMAD *et al.*, 2017; FULCERI *et al.*, 2018; HEUNIS; ALDRICH; DE VRIES, 2016; INGA JÁCOME *et al.*, 2016; LI; KARNATH; XU, 2017; MASI *et al.*, 2017; RUGGERI *et al.*, 2014). O termo "biomarcador" tem sido definido como uma medida biológica que difere entre os grupos ou está associado a algum aspecto de uma condição (ANDERSON, 2015; ZWAIGENBAUM; PENNER, 2018). Os biomarcadores poderiam auxiliar no diagnóstico precoce, na mensuração de risco de desenvolvimento do TEA, no prognóstico, na caracterização de subgrupos de pacientes e na definição de subconjuntos de indivíduos que responderiam mais favoravelmente a tratamentos específicos (ANDERSON, 2015; GOLDANI *et al.*, 2014; ZWAIGENBAUM; PENNER, 2018).

2.1.4 Etiologia e Neurobiologia

Embora várias definições e avanços tenham sido feitos em relação ao TEA, os aspectos etiológicos permanecem obscuros (EISSA *et al.*, 2018). A verdade inegável, quando se olha para todas as teorias atuais sobre a causa do TEA, é que "é tempo para desistir de uma única explicação para o autismo" (HAPPÉ; RONALD; PLOMIN, 2006). O número crescente de publicações, especialmente na última década, não deixa dúvidas quanto ao aspecto multifatorial do espectro e indica uma interação complexa entre fatores genéticos/ambientais e fatores do sistema imunológico (GOTTFRIED *et al.*, 2015).

O papel da genética é fortemente sugerido pelo risco 15 a 20 vezes maior de recorrência em irmãos de crianças afetadas em comparação com a população geral e por 60 a 90% de concordância em gêmeos monozigóticos contra 10% em gêmeos dizigóticos (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009). A diferença entre as taxas de concordância entre monozigóticos e dizigóticos sugere interações entre os fatores de risco (gene-gene ou gene-ambiente), que poderiam resultar de fatores tóxicos ambientais ou epigenéticos que alterariam o funcionamento do gene (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009). Estudos têm implicado várias regiões cromossômicas para a presença de loci de susceptibilidade. Como o autismo não é uma entidade clínica única, pode ser visto como uma manifestação comportamental de dezenas ou talvez centenas de distúrbios genéticos. Estima-se que existam mais de 500 loci genéticos distintos que podem ser relacionados com TEA (GOLDANI *et al.*, 2014; TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Uma grande variedade de mecanismos genéticos pode estar envolvida, como desordens genéticas únicas, anormalidades cromossômicas e variação no número de cópias (CNV). Esses diferentes mecanismos resultam em variados riscos de herdabilidade (OLIVIÉ, 2012).

A associação entre TEA e síndromes genéticas está bem estabelecida. Cerca de 3% dos pacientes com TEA tem Síndrome do X-Frágil (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009), e aproximadamente um terço desses indivíduos tem autismo (SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013). Outras síndromes e doenças genéticas estão associadas ao TEA são:, tais como: Síndrome do X Frágil, Síndrome de Cohen, Síndrome de Joubert, Síndrome de Smith– Magenis, Síndrome de Smith-Lemli-Opitz, Deficiência de Adenil-succinato liase, Neurofibromatose, Síndrome de San Filippo, Esclerose Tuberosa, Deleção do 22q.11, Deficiência de Creatina, Síndrome de Angelman, Fenilcetonúria, Síndrome de Down, Distrofia Muscular de Duchenne, Síndrome de CHARGE, Síndrome de Lange, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Sotos, Síndrome de Cowden, Síndrome de Bannayan–Riley–Ruvalcaba (COHEN *et al.*, 2005; SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013). Juntas, elas correspondem a 10% de todos os casos (COHEN *et al.*, 2005; MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN, 2012; OLIVIÉ, 2012).

Até o momento, poucas causas não genéticas são reconhecidas no TEA, como encefalite herpética, infecções congênitas (ex. embriopatia por rubéola e citomegalovírus), síndrome alcoólico-fetal e exposição pré-natal ao ácido valpróico (VPA) (MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004; OLIVIÉ, 2012). Alguns estudos sugerem que a exposição intra-útero à

talidomida e ao misoprostol também seriam fatores de risco para autismo (MILES, 2011; MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004). Uma metanálise com 40 estudos de fatores de risco perinatais e neonatais para o autismo encontrou pouca evidência para implicar um único fator na etiologia do TEA; no entanto, sugere que a exposição a várias complicações neonatais poderia aumentar o risco de desenvolver o transtorno. Dentre as mais fortemente associadas estão a apresentação anormal, as complicações do cordão umbilical, o sofrimento fetal, a lesão ou trauma do nascimento, o nascimento múltiplo, a hemorragia materna, o nascimento no verão, o baixo peso ao nascimento, ser pequeno para a idade gestacional, malformação congênita, o Apgar baixo no quinto minuto, dificuldade de alimentação, aspiração de mecônio, a anemia neonatal, a incompatibilidade ABO ou Rh e a hiperbilirrubinemia (GARDENER; SPIEGELMAN; BUKA, 2011). Outra metanálise do mesmo grupo com fatores de risco pré-natais sugere que a idade avançada dos pais, o uso materno de medicação pré-natal, o sangramento na gestação, o diabetes gestacional, a ordem de nascimento (ser o primeiro ou o terceiro filho em diante) e ter uma mãe imigrante (GARDENER; SPIEGELMAN; BUKA, 2009) estariam associados ao aumento do risco para desenvolver o TEA. Num estudo de coorte retrospectivo avaliando 95 mil crianças, a vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) não foi associada com um risco aumentado de TEA, mesmo em crianças com irmãos mais velhos com autismo (JAIN *et al.*, 2015). Estudos têm evidenciado que o aumento da idade materna é um fator de risco para o transtorno, tanto independentemente quanto em combinação com o aumento da idade paterna (KONG *et al.*, 2012; SANDIN *et al.*, 2012).

Devido à grande heterogeneidade na forma como o TEA se expressa, não é surpresa que tentativas de identificar uma teoria explicativa única para o autismo tenham sido fracassadas (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009). Várias anormalidades neuroanatômicas foram identificadas em estruturas cerebrais e circuitos neuronais, como o cerebelo, o sistema límbico, o corpo caloso e o córtex cerebral (MEAD; ASHWOOD, 2015). Os estudos descobriram, por exemplo, o aumento do tamanho do cérebro em períodos precoces determinando um aumento da circunferência da cabeça (AMARAL; SCHUMANN; NORDAHL, 2008; COURCHESNE *et al.*, 2001), aumento anormal da amígdala (AMARAL; SCHUMANN; NORDAHL, 2008; BREECE *et al.*, 2013) e substância branca aberrante em regiões do cérebro implicadas na cognição social (MINSHEW; WILLIAMS, 2007).

Embora um consenso sobre aspectos estruturais e funcionais anormais no TEA permaneça difícil, uma série de estudos sobre esses tópicos reúnem dados importantes, e várias anormalidades foram identificadas, incluindo defeitos sutis na arquitetura cortical,

possivelmente causados pela perturbação da remodelação ocorrida num período crítico da formação da rede neural. Tais mudanças levam a defeitos de substância branca e problemas de conectividade (GOTTFRIED *et al.*, 2015).

A disfunção imunológica tem sido uma característica reconhecida nos distúrbios do espectro do há várias décadas (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014) e será abordada mais detalhadamente no tópico “TEA e o Sistema Imunológico”.

2.1.5 Tratamento

Apesar do avanço no diagnóstico precoce e nas intervenções, nenhum tratamento disponível até o momento é capaz de reverter completamente os principais sintomas do TEA (BENVENUTO *et al.*, 2013; GOEL *et al.*, 2018; ROSSIGNOL, 2009). Terapia educacional com foco no comportamento, comunicação e habilidades adaptativas continua sendo o pilar do tratamento para o TEA. Apesar da inexistência de medicamentos para o tratamento específico do autismo, os fármacos são muitas vezes úteis no alívio de diferentes sintomas associados ao transtorno, incluindo hiperatividade e irritabilidade. Uma gama de terapias alternativas existe, embora tenham pouco embasamento científico para apoiar sua utilização (TCHACONAS; ADESMAN, 2013).

2.1.5.1 Tratamento não farmacológico

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

sobre autismo (AL-QABANDI; GORTER; ROSENBAUM, 2011). Existem evidências de que maior intensidade do tratamento não farmacológico (horas por semana) e uma maior duração (em meses) leva a melhores resultados. Crianças com TEA devem ter acesso a pelo menos 25 horas por semana de intervenção abrangente para desenvolver a comunicação e a linguagem, melhorar habilidades sociais e reduzir comportamento desajustado (MAGLIONE *et al.*, 2012). Dentre os modelos de terapia intervencionista encontram-se o *Applied Behavior Analysis* (ABA), *Treatment and Educational of Autistic and Related Communication- Handicapped Children* (TEACCH) e *Developmental Individual Difference Relations-Ship-Based Approach* (Floortime) (WARREN *et al.*, 2011). Atualmente os programas de intervenção baseados no ABA são vistos como primeira linha para o tratamento de TEA na infância (BRENTANI *et al.*, 2013). Nas terapias comportamentais não intervencionistas destaca-se o método *Picture Exchange Communication System* (PECS), que é um sistema de comunicação funcional, utilizando figuras (GANZ *et al.*, 2012), assim como a musicoterapia (GOTTFRIED *et al.*, 2018; KIM; WIGRAM; GOLD, 2008).

2.1.5.2 Tratamento farmacológico

Atualmente não existem medicamentos disponíveis para tratar os déficits de comunicação e interação social do autismo, embora esse seja um assunto de intensos esforços de investigação. Apesar dos diferentes níveis de suporte empírico para os medicamentos direcionados, o tratamento medicamentoso de crianças e adultos com TEA é prática clínica comum. Em torno de 45-75% das crianças com TEA são medicadas com drogas psicotrópicas (BRENTANI *et al.*, 2013; EISSA *et al.*, 2018). Intervenções farmacológicas incluem diferentes classes de drogas, incluindo psicoestimulantes, antipsicóticos atípicos, antidepressivos, agonista alfa-2 adrenérgicos, inibidores da colinesterase, antagonistas do receptor NMDA e anticonvulsivantes estabilizadores do humor (EISSA *et al.*, 2018; SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018). A maioria da utilização de psicofármacos em TEA é *off-label*, existindo atualmente apenas dois medicamentos (risperidona e aripiprazol) aprovados pelo FDA (GOEL *et al.*, 2018; KAPLAN; MCCRACKEN, 2012). É importante ressaltar que risperidona e aripiprazol estão associados a eventos metabólicos adversos, como ganho de peso, dislipidemia e hiperglicemia (YOUNG; FINDLING, 2015).

2.1.6 Prognóstico

Dados recentes sugerem que os resultados das intervenções em crianças com TEA podem ser altamente variáveis. Crianças com autismo podem diferir consideravelmente no início e no acompanhamento da patologia, não apenas em termos de gravidade, mas também no que diz respeito a deficiências de desenvolvimento associados, condições médicas e comorbidade psiquiátrica (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Os mais importantes fatores determinantes de prognóstico parecem ser os testes de funcionamento intelectual realizados na infância e escores de QI.(HOWLIN *et al.*, 2004; HOWLIN; MAWHOOD; RUTTER, 2000). O desfecho também parece ser pior naqueles que falham em adquirir linguagem funcional até a idade de 5-6 anos (BRENTANI *et al.*, 2013; HOWLIN *et al.*, 2004).

O nível socioeconômico está implicado como um fator significativo para o melhor desenvolvimento, pois engloba variáveis do ambiente como a tipo de casa e bairro, além da qualidade de tratamento, educação e o acesso a serviços e a intervenções precoces (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Infelizmente, apenas uma pequena minoria de indivíduos com TEA consegue trabalhar, viver de forma independente e desenvolver relacionamentos sociais significativos. A maioria permanece muito dependente do suporte dos pais ou de outros cuidadores. Poucos se casam e a maioria estuda em classes especiais (HOWLIN *et al.*, 2004).

2.2 TEA E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

A interação envolvendo os sistemas nervoso e imune engloba um caminho complexo e intrincado de sinais com extensa comunicação entre eles, tanto na saúde quanto na doença (GOTTFRIED *et al.*, 2015). Durante muito tempo pensou-se que o cérebro fosse “imunologicamente privilegiado”, sendo isolado da influência do sistema imunológico pela barreira hematoencefálica (BHE), com apenas a micróglia fornecendo funções imunes dentro do cérebro. A micróglia é um conjunto de células imunes inatas residentes do sistema nervoso central (SNC), que desempenham papéis vitais na manutenção e desenvolvimento neuronal (MEAD; ASHWOOD, 2015). Ela fagocita neurônios apoptóticos, modulando inflamação (TIAN *et al.*, 2012). Também regula a formação de sinapses e plasticidade por fagocitose de

sinapses opsonizadas com componentes do complemento (STREIT, 2001). A redução da fagocitose resulta no acúmulo de detritos celulares e tem efeitos nocivos nos neurônios circundantes, o que pode desempenhar um papel nas doenças neurodegenerativas e desordens do desenvolvimento (SCHWARTZ *et al.*, 2013).

De fato, grande parte da interação entre os neurônios e as células do sistema imunológico ocorre na periferia e, quando ocorre no SNC, geralmente ocorre em consequência de uma quebra na BHE. No entanto, novas evidências sugerem que o sistema imunológico periférico pode desempenhar um papel no funcionamento neuronal (MEAD; ASHWOOD, 2015). Por exemplo, num estudo em que o sistema imune adaptativo foi depletado em camundongos, foi observada uma redução na cognição desses animais, e esse fenômeno foi revertido após células T autólogas serem injetadas, indicando uma importância das células T além de seu papel imunológico (BRYNSKIKH *et al.*, 2008). Um caminho de comunicação alternativo entre o SNC e o sistema imune periférico foi recentemente proposto com base no trabalho inovador de Louveau *et al.*, que identificou vasos linfáticos funcionais no SNC que transportam fluidos e células imunológicas do líquido cefalorraquidiano (LOUVEAU *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2017).

As citocinas, moléculas que estão ligadas à comunicação entre as células imunes, desempenham um papel importante no neurodesenvolvimento, especialmente as citocinas pró-inflamatórias (MEAD; ASHWOOD, 2015). A interleucina 1 (IL-1) está envolvida na manutenção da potenciação a longo prazo, um correlato experimental de formação de memória, bem como na indução e inibição específicas da proliferação de células progenitoras neurais. A desregulação na expressão de IL-1 gera comprometimento na memória e na aprendizagem. Já IL-6 e seus receptores são expressos no cérebro, e essa expressão aumenta durante uma resposta inflamatória (MEAD; ASHWOOD, 2015). De fato, as citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), são capazes de modular a atividade neuronal (ONORE; CAREAGA; ASHWOOD, 2012), e a IL-6 promove a sobrevivência dos oligodendrócitos (VITKOVIC *et al.*, 2000). Citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6, IL-12, interferon gama (IFN- γ) e TNF- α , estão envolvidas nos efeitos pleiotrópicos do SNC durante o neurodesenvolvimento (THEOHARIDES *et al.*, 2016).

A literatura identifica perfis anormais de citocinas em depressão, transtorno bipolar e esquizofrenia (MASI *et al.*, 2017), sugerindo coletivamente que as citocinas induzem tanto alterações no comportamento como sintomas neuropsiquiátricos, e que inflamação é um fator-chave fundamental na psicopatologia (CAPURON; CASTANON, 2016). Além disso, uma

revisão sistemática avaliando marcadores pró-inflamatórios em quase 4.000 crianças e adolescentes com distúrbios do neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricos, incluindo TEA, identificou evidências preliminares do papel da inflamação nessas condições e uma associação com um estado pró-inflamatório (MITCHELL; GOLDSTEIN, 2014).

A natureza multifacetada do autismo resultou em investigações com o objetivo de caracterizar subtipos de TEA, e uma compreensão dos mecanismos biológicos que conduzem sua fisiopatologia está em evolução. O acúmulo de evidências de alterações no funcionamento do sistema imunológico central e periférico apoia a proposta de que há um subgrupo de indivíduos com TEA que têm alguma forma de desregulação do sistema imunológico (MASI *et al.*, 2017). Na tabela 1, encontram-se algumas alterações no sistema imune periférico observadas em pacientes com TEA em relação a controles saudáveis.

A primeira sugestão de uma ligação entre o sistema imunológico e TEA ocorreu em 1976, quando um estudo descobriu que 5 de 13 crianças autistas tinham títulos de anticorpos indetectáveis após vacinação para rubéola, enquanto todos os indivíduos de controle tinham títulos detectáveis (GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; STUBBS, 1976). Já em 1977, o mesmo autor observou que a resposta de linfócitos à estimulação com o mitógeno fitohemaglutinina mostrou ser diferente entre crianças com TEA e controles (STUBBS; CRAWFORD, 1977). Nas últimas décadas, estudos em modelos animais e humanos mostraram evidências crescentes de alterações no sistema imunológico central e periférico no TEA (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

Muitos estudos também demonstraram uma correlação entre o intensidade de sintomas autistas e os níveis de citocinas (AL-AYADHI, 2005; AL-AYADHI; MOSTAFA, 2012, 2013, ASHWOOD *et al.*, 2008, 2011a, 2011b; CAREAGA *et al.*, 2017; EL-ANSARY *et al.*, 2016; EL GOHARY *et al.*, 2015; ENSTROM *et al.*, 2008; FERGUSON *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2017; JYONOUCHI *et al.*, 2005; JYONOUCHI; GENG; DAVIDOW, 2014; MAKINODAN *et al.*, 2017; NAPOLIONI *et al.*, 2013; RICCI *et al.*, 2013; ROSE; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2016; YANG *et al.*, 2015), níveis de imunoglobulina (IgM e IgG) (ENSTROM *et al.*, 2009; HEUER *et al.*, 2008), de auto-anticorpos reativos para tecido neural (GOINES *et al.*, 2011; MOSTAFA; AL-AYADHI, 2012; PIRAS *et al.*, 2014), e auto-anticorpos maternos (BRAUNSCHWEIG *et al.*, 2012; PIRAS *et al.*, 2014). Um resumo encontra-se na Tabela 2.

Tabela 1 - Achados pós-natais no sistema imune periférico de crianças com TEA. Os resultados estão listados como diferenças significativas observadas em crianças com TEA em comparação com os controles.

Achados no sistema imune de pacientes com TEA
Resposta linfocitária alterada a estímulo com fitohemaglutinina
Plasma contendo auto-anticorpos que se ligam a proteínas encontradas em cortes de tálamo e hipotálamo de cérebros humanos adultos
Níveis plasmáticos aumentados de IgG4
Níveis séricos aumentados de IgG total, IgG2 e IgG4
Níveis plasmáticos reduzidos de IgG total
Níveis plasmáticos aumentados de IL-1 β , IL-6, IL12p40 e IL-8
Níveis séricos aumentados de IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-12, TNF- α e BDNF
Aumento no número total de monócitos no sangue periférico (não confirmado em estudo subsequente).
Monócitos produzem níveis maiores de neopterin após estímulo com IFN- γ
Monócitos do sangue periférico produzem níveis mais altos de IL-1 β após estímulo com lipopolisacarídeo
Frequência aumentada de monócitos expressando HLA-DR em culturas não estimuladas e após estímulo com ácido lipoteicoico
Expressão aumentada de CD95 em linfócitos de sangue periférico
Aumento no número total de células NK CD56+, células B CD20+ e células B CD38+
Expressão aumentada de HLA-DR em células T
Aumento de CD26 em células T CD8+
Aumento de níveis plasmáticos de IFN- γ e IL-12
Níveis aumentados de IFN- γ e IL-1Ra em sobrenadante de cultura não estimulada de PBMCs
Número reduzido de células T CD3GITS+ em cultura não estimulada
Proporções reduzidas de células T CD4+ e CD8+ IFN- γ + e IL-2+ e proporções aumentadas de células T CD4+ e CD8+ IL-4+ em PBMCs estimuladas com acetato miristato de forbol e ionomicina
Número aumentado de células T CD4+ produtoras de IFN- γ em PBMCs estimulados com SEB e anti-CD28
<i>Up-regulation</i> de genes relacionados a células NK, como perforina e granzima B
Níveis aumentados de IFN- γ em células NK não estimuladas
Razão mais baixa de células T CD4+/CD8+ em sangue periférico
Número inalterado de células B
Níveis similares de IL-17
Níveis plasmáticos reduzidos de TGF- β
Número reduzido de células T IL-10+ CD-3+ em sangue periférico e mucosa
Níveis plasmáticos elevados de MCP-1, CCL5 e eotaxina
Níveis séricos elevados de MDC e TARC
Expressão diferenciada de genes associados a rotas de citotoxicidade por células NK

TEA: transtorno do espectro autista; IgG: imunoglobulina; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; IFN: interferon; NK: *natural killer*; PBMC: célula mononuclear de sangue periférico; SEB: enterotoxina B estafilocócica; TGF: fator de transformação do crescimento; MCP: proteína de quimioatração de monócitos; CCL5: quimiocina CC ligante 5; MDC: quimiocina derivada de macrófago; TARC: quimiocina tímica regulada pela ativação. Adaptado de (MEAD; ASHWOOD, 2015).

Muitos estudos também demonstraram uma correlação entre o intensidade de sintomas autistas e os níveis de citocinas (AL-AYADHI, 2005; AL-AYADHI; MOSTAFA, 2012, 2013, ASHWOOD *et al.*, 2008, 2011a, 2011b; CAREAGA *et al.*, 2017; EL-ANSARY *et al.*, 2016;

EL GOHARY *et al.*, 2015; ENSTROM *et al.*, 2008; FERGUSON *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2017; JYONOUCHI *et al.*, 2005; JYONOUCHI; GENG; DAVIDOW, 2014; MAKINODAN *et al.*, 2017; NAPOLIONI *et al.*, 2013; RICCI *et al.*, 2013; ROSE; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2016; YANG *et al.*, 2015), níveis de imunoglobulina (IgM e IgG) (ENSTROM *et al.*, 2009; HEUER *et al.*, 2008), de auto-anticorpos reativos para tecido neural (GOINES *et al.*, 2011; MOSTAFA; AL-AYADHI, 2012; PIRAS *et al.*, 2014), e auto-anticorpos maternos (BRAUNSCHEWIG *et al.*, 2012; PIRAS *et al.*, 2014). Um resumo encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Citocinas e associação com severidade dos sintomas relacionados ao TEA. Citocinas dosadas no plasma e suas associações com severidade de sintomas relacionados ao autismo.

Citocina	n (TEA)	Medidas	Achados	Referência
TGF-β1	75	ABC, VABS	Níveis reduzidos associados a menor comportamento adaptativo e piores sintomas comportamentais	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2008)
Eotaxina	80	ABC, MSEL, VABS	Níveis aumentados associados a maior letargia, estereotipia e hiperatividade (ABC)	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011a)
			Níveis aumentados associados a maior prejuízo de recepção visual, motricidade fina e linguagem receptiva e expressiva (MSEL)	
MCP-1	80	ABC, MSEL, VABS	Níveis aumentados associados a maiores prejuízos em comunicação, habilidades da vida diária, socialização e habilidades motoras (VABS)	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011a)
			Níveis aumentados associados a maior prejuízo de recepção visual, motricidade fina e linguagem expressiva (MSEL)	
CCL5	80	ABC, MSEL, VABS	Níveis aumentados associados a maior letargia, estereotipia e hiperatividade (ABC)	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011a)
			Níveis aumentados associados a maior prejuízo de recepção visual, motricidade fina e linguagem expressiva (MSEL)	

Níveis aumentados associados a maiores prejuízos em comunicação e socialização (VABS)

IL-1β	97	ADI-R, ABC, MSEL, VABS	Níveis aumentados associados a maior estereotipia (ABC)	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
IL-4	97	ADI-R, ABC, MSEL, VABS	Níveis aumentados associados a maior prejuízo em comunicação não-verbal (ADI-R)	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
IL-6	97	ADI-R, ABC, MSEL, VABS	Níveis aumentados associados a maior estereotipia (ABC)	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
IL-8	97	ADI-R, ABC, MSEL, VABS	Níveis aumentados associados a maior letargia, estereotipia e hiperatividade (ABC) Níveis reduzidos associados a melhor recepção visual e linguagem receptiva e expressiva (MSEL)	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
			Níveis reduzidos associados a melhores habilidades da vida diária (VABS)	
IL-12p40	97	ADI-R, ABC, MSEL, VABS	Níveis aumentados associados a maior estereotipia e letargia (ABC)	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
TGF-β1	30	CARS	Níveis reduzidos associados a maior severidade	(EL GOHARY <i>et al.</i> , 2015)

TEA: transtorno do espectro autista; TGF: fator de transformação do crescimento; MCP: proteína de quimioatração de monócitos; CCL5: quimiocina CC ligante 5; IL: interleucina; ABC: *Aberrant Behavior Checklist*; VABS: *Vineland Adaptive Behavior Scales*; MSEL: *Mullen Scales of Early Learning*; ADI-R: *Autism Diagnostic Interview-Revised*. Adaptado de (MASI *et al.*, 2017)

Algumas das muitas mutações genéticas associadas com o TEA ocorrem em genes que estão envolvidos no sistema imunológico ou têm duplo papel nos sistemas nervoso e imunológico, apoiando a ideia de que o sistema imune desempenha um papel no desenvolvimento do TEA (MEAD; ASHWOOD, 2015). Alguns desses genes estão listados na Tabela 3. Por exemplo, o risco de TEA foi associado a uma variante genética na região promotora do receptor de tirosina quinase do MET, que contribui para o desenvolvimento do córtex cerebral e do cerebelo, e também serve para regular a função e tolerância imunológica (CAMPBELL *et al.*, 2006). Uma associação entre alguns alelos do antígeno leucocitário humano (HLA) e doenças autoimunes tem sido estabelecido. Vários estudos revelaram ligações

entre HLA e TEA, com crianças com autismo apresentando maior frequência do alelo HLA-DRB1*11 e menor frequência do alelo HLA-DRB1*03, além de aumento do risco de TEA em filhos de mãe HLA-DR4 (GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018).

Tabela 3 - Genes alterados em TEA e correlacionados com função imune.

Gene	Função
JARID2	Repressor transcricional que regula a hematopoese
TPO	Enzima que produz hormônios tireoidianos
MET	Promove diferenciação e proliferação de células hematopoiéticas e exerce amplos efeitos anti-inflamatórios
PRKCB	Medeia ativação de células B, migração de células T, função celular de apresentação de antígenos e liberação de citocinas
HLA-A2	Expresso em todas as células nucleadas para identificá-las como “próprias” às células do sistema imune; regula resposta imune celular a patógenos intracelulares
HLA-DRB1	Inicia respostas imunes celulares a patógenos extracelulares
HLA-DRB4	Apresenta peptídeos derivados de proteínas extracelulares
C4B	Proteína da cascata do complemento envolvida na remoção de patógenos e debris celulares
PTEN	Afeta a diferenciação e função da célula T reguladora
TSC1	Promove aumento de interleucina-12 e conversão de macrófagos M2
TSC2	Regula a resposta imunológica inata
MIF	Guia e controla a resposta imune

Adaptado de (GOTTFRIED *et al.*, 2015; OHJA *et al.*, 2018)

A presença de auto-anticorpos maternos dirigidos contra as proteínas do cérebro fetal sustenta a importância das respostas imunes maternas no TEA. Em condições normais, os anticorpos IgG maternos são capazes de atravessar a placenta e fornecer a transferência de anticorpos protetores da mãe para o feto. No entanto, assim como anticorpos protetores, anticorpos nocivos que se ligam a proteínas próprias também podem ser transferidos. Esses anticorpos apresentam níveis detectáveis na circulação fetal com 18 semanas de gestação e persistem em altas concentrações na criança nos primeiros 6 meses após o nascimento. A presença de IgG materna após esse período de tempo poderia gerar alterações no neurodesenvolvimento e levar ao TEA (BRAUNSCHWEIG *et al.*, 2008; MEAD; ASHWOOD, 2015).

Diversos estudos em modelos animais confirmam que alterações imunes durante a gravidez resultam em anormalidades no comportamento (GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018). Estudos mostraram que soro e plasma de mães de crianças diagnosticadas com autismo continham anticorpos com autorreatividade para o cérebro fetal humano (BRAUNSCHWEIG *et al.*, 2008; CROEN *et al.*, 2005; SINGER *et al.*, 2008). Interessantemente, quando as frações de IgG contendo os auto-anticorpos de mães de crianças com TEA foram injetadas em macacas rhesus grávidas, seus descendentes mostraram comportamento social anormal, e os machos mostraram um aumento do volume cerebral (BAUMAN *et al.*, 2013).

A infecção durante a gravidez também pode resultar em alterações nas trajetórias do neurodesenvolvimento, seja por infecção direta do feto ou devido às respostas imunes da mãe (MEAD; ASHWOOD, 2015). Vários estudos, incluindo recente metanálise (JIANG *et al.*, 2016), fazem uma correlação positiva entre infecção materna durante a gestação e posterior diagnóstico de TEA na criança (ATLADÓTTIR *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2008; ZERBO *et al.*, 2013). Aumento da idade materna, obesidade, diabetes gestacional e presença de variante do gene MET materno rs1858830 alelo "C" foram associados com o desencadeamento de TEA por meio da ativação imune materna (ESTES; MCALLISTER, 2015; GOTTFRIED *et al.*, 2015).

O plasma de crianças com TEA contém auto-anticorpos separados e diferentes daqueles das mães (descritos anteriormente) que se ligam a proteínas em seções do tálamo e hipotálamo de cérebro humano adulto (MEAD; ASHWOOD, 2015). Estudo utilizando o soro de 100 crianças com autismo entre 4 e 11 anos encontrou aumento significativo de anticorpos anti-DNA e anticorpos antinucleares em comparação com 100 crianças saudáveis (MOSTAFA; EL-SHERIF; AL-AYADHI, 2014).

Familiares de crianças com TEA, especialmente mães, apresentam maior incidência de doenças autoimunes (GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015). Estudos sugerem que o risco de TEA seja significativamente aumentado em crianças cujas mães tenham artrite reumatoide, doença celíaca, hipotireoidismo, diabetes tipo 1 e psoríase (ATLADOTTIR *et al.*, 2009; CROEN *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2014). Vários estudos demonstraram associações de TEA com autoimunidade e alergias (MEAD; ASHWOOD, 2015).

Alterações também foram observadas nos níveis e subtipos de IgG, IGM e IgE em indivíduos com TEA (GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; MEAD;

ASHWOOD, 2015). Em comparação com crianças neurotípicas, as crianças com TEA mostraram níveis significativamente aumentados de IgG4 (subclasse de IgG tem características e função biológica diferente de outras subclasses IgG) (ENSTROM *et al.*, 2009), e a análise dos níveis plasmáticos de imunoglobulinas em mais de 100 indivíduos com TEA revelou níveis reduzidos de IgG e IgM (HEUER *et al.*, 2008).

Há evidências convincentes de que os níveis de citocinas, tanto na periferia quanto no SNC, estão alterados em crianças com TEA. Vários estudos descobriram um aumento de citocinas pró-inflamatórias secretadas por células imunes inatas, especialmente células da linhagem mieloide, em crianças com TEA (GOTTFRIED *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015). O plasma de crianças pequenas com TEA mostrou aumento significativo nas citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-12p40 e IL-8 quando comparado ao plasma de crianças típicas (ASHWOOD *et al.*, 2011b). Além disso, aumento do nível de TNF- α foi encontrado no líquido cefalorraquidiano de crianças com TEA (CHEZ *et al.*, 2007). Uma metanálise com dados de pacientes com TEA demonstra claramente alterações em diferentes citocinas, tanto no plasma como no cérebro dessas crianças (GOTTFRIED *et al.*, 2015). Esses dados são demonstrados na Tabela 4.

Além disso, uma prevalência elevada de outras comorbidades relacionadas ao sistema imunológico, incluindo doenças autoimunes, alergias e psoríase, tem sido encontradas em crianças com autismo em comparação com controles saudáveis (ZERBO *et al.*, 2015).

Tabela 4 - Citocinas alteradas no TEA.

Citocina	Nível comparado a controles	Fonte	Sujeitos avaliados	Referência
INTERLEUCINAS				
IL-1	↑	Plasma	Crianças com TEA	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
	↑	Plasma	Crianças com TEA	(SUZUKI <i>et al.</i> , 2011)
	↑	Plasma	Adultos com TEA grave	(EMANUELE <i>et al.</i> , 2010)
	↑	Células do sangue	Crianças com TEA	(JYONOUCHI; SUN; LE, 2001)
	↑ ↑ ↓	(estímulo com TLR2 ou TLR4) (estímulo com TLR-9)	Células do sangue Células do sangue	Crianças com TEA Crianças com TEA
IL-6	↑	Plasma	Crianças com TEA	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)

	↑	Plasma	Adultos com TEA grave	(EMANUELE <i>et al.</i> , 2010)
	↑	Células do sangue	Crianças com TEA	(JYONOUCHI; SUN; LE, 2001)
	(estímulo com TLR2 ou TLR4)	Células do sangue	Crianças com TEA	(ENSTROM <i>et al.</i> , 2010)
	(estímulo com TLR-9)	Células do sangue	Crianças com TEA	(ENSTROM <i>et al.</i> , 2010)
	↑	Linfoblastos	Crianças com TEA	(MALIK <i>et al.</i> , 2011)
	↑	Cérebro (<i>post mortem</i>)	Crianças com TEA	(WEI <i>et al.</i> , 2011)
	↑	Cérebro (<i>post mortem</i>)	Crianças e adultos com TEA	(VARGAS <i>et al.</i> , 2005)
	↑	Cérebro (<i>post mortem</i>)	Crianças e adultos com TEA	(XU; LI; ZHONG, 2015)
IL-12 P40	↑	Plasma	Crianças com TEA	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
QUIMIOCINAS				
CCL2	↑	Cérebro (<i>post mortem</i>)	Crianças e adultos com TEA	(VARGAS <i>et al.</i> , 2005)
		Plasma	Crianças com TEA	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
FATOR DE NECROSE TUMORAL				
TNF-α	↑	LCR	Crianças com TEA	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)
		Cérebro (<i>post mortem</i>)	Crianças com TEA	(LI <i>et al.</i> , 2009)
INTERFERON				
IFN-γ	↑	Soro (na gestação)	Mulheres que geraram filho com TEA	(GOINES; ASHWOOD, 2013)
		Sangue total e soro	Crianças com TEA	(CROONENBERGHS <i>et al.</i> , 2002)
		Cérebro (<i>post mortem</i>)	Crianças e adultos com TEA	(LI <i>et al.</i> , 2009)
FATORES DE CRESCIMENTO				
TGF-β	↑	Plasma	Crianças com TEA	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2008)
	↓	Soro	Adultos com TEA	(OKADA <i>et al.</i> , 2007)
BDNF	↑	Cérebro (<i>post mortem</i>)	Crianças e adultos com TEA	(VARGAS <i>et al.</i> , 2005)
	↑	Plasma	Crianças com TEA	(ASHWOOD <i>et al.</i> , 2011b)

TEA: transtorno do espectro autista; IL: interleucina; TLR: receptores do tipo Toll; TNF: fator de necrose tumoral; LCR: líquido cefalorraquidiano; IFN: interferon; TGF: fator de transformação do crescimento; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro. Adaptado de (GOTTFRIED *et al.*, 2015).

Os achados na periferia refletem algumas descobertas no SNC. Amostras congeladas do córtex cerebral de crianças com TEA encontraram níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), IFN- γ e IL-8 (LI *et al.*, 2009). Outro grupo de pesquisadores confirmou o aumento de IL-6 no cerebelo de crianças com TEA (WEI *et al.*, 2011). Outras avaliações de cérebro *post mortem* de pacientes com TEA encontraram sinais de inflamação do SNC, ativação da micróglia e astrócitos ativados (MORGAN *et al.*, 2010; VARGAS *et al.*, 2005). Tomografia computadorizada por emissão de pósitron (PET) de adultos jovens com TEA mostrou evidências que também indicam aumento da ativação microglial (SUZUKI *et al.*, 2013).

Síndromes genéticas ligadas ao *Phosphatase and tensin homolog gene* (PTEN) são frequentemente associadas ao autismo ou retardo mental. Os dados coletivos a partir de estudos identificaram mutações patogênicas no PTEN em 15 de 318 indivíduos (5%) com TEA. Uma análise retrospectiva desses dados mostrou que macrocefalia estava presente em todos os casos positivos (KING *et al.*, 2014; MCBRIDE *et al.*, 2010; SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013). Além do cérebro, a proteína PTEN exerce um papel crucial na coordenação das atividades da fosfatase, afetando a diferenciação e função da célula T reguladora (Treg) e função mitocondrial (CHEN *et al.*, 2017). Em humanos, a mutação da PTEN poderia levar a sintomas auto-inflamatórios e autoimunes por meio da ativação excessiva de células T, além de alterações nas respostas imunes (TSUJITA *et al.*, 2016). Curiosamente, a expressão do PTEN é regulada por respostas de imunidade inata e, em parte, pela expressão de microRNA. Por exemplo, miR-181a modula a ativação de células T por regulação positiva do PTEN (SUN; SIT; FEINBERG, 2014).

Interessante estudo de 2017 correlacionou a expressão de miRNA com a relação de interleucinas IL1 β /IL10 e sintomas autistas. Nesse estudo verificou-se que pacientes com TEA e sem alterações na relação IL1 β /IL10 não apresentavam perfis de expressão de miRNA diferente dos controles, contudo, aquelas com alterações na relação IL1 β /IL10 apresentavam miRNA com expressão diferente dos controles. Os miRNA alterados foram aqueles que afetam as vias chaves de sinalização que medeiam ou regulam processos inflamatórios: miR-342, miR-181a-1/2, miR-93, miR-223 e miR-1248. Além disso, pontuações mais baixas da subescala ABC Letargia foram observados em indivíduos com TEA e baixas razões IL-1 β /IL-10, enquanto escores na subescala ABC Fala inapropriada foram menores naqueles com razões altas (JYONOUCHI *et al.*, 2017).

Os dados acima corroboram a hipótese de que existe um subgrupo de indivíduos com TEA que apresenta alguma forma de desregulação do sistema imunológico, e que, pelo menos em parte, essa desregulação pode contribuir para o fenótipo autista. (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014). Muitos pesquisadores sugerem a possibilidade de que a disfunção imune no TEA possa ser caminho viável para a intervenção farmacológica, e um subgrupo de indivíduos com TEA poderia se beneficiar de terapias de base imunológica. (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; ESTES; MCALLISTER, 2015; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; LACIVITA *et al.*, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; MELTZER; VAN DE WATER, 2017; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

Uma revisão das terapias com ação no sistema imune já utilizadas em ensaios clínicos em pacientes com diagnóstico de TEA encontra-se no Artigo 1.

2.3 RESVERATROL

O Resveratrol (RSV) é uma molécula simples inicialmente isolada em extrato derivado da planta *Cassia quinquangulata*, originária do Peru, durante a procura por novos agentes quimiopreventivos contra o câncer (JANG *et al.*, 1997). A função fisiológica do RSV em plantas não está bem definida. Propõe-se que seja produzido durante episódios de estresse ambiental ou ataque patogênico. O RSV foi encontrado em pelo menos 72 espécies de plantas (distribuídas em 31 gêneros e 12 famílias), algumas das quais são componentes da dieta humana, como amoras, amendoim e uva. Encontram-se quantidades relativamente elevadas nesta última, possivelmente devido à resposta de *Vitis vinifera* à infecção fúngica. A casca da uva fresca contém cerca de 50 a 100 µg de RSV por grama, e a concentração no vinho tinto está na gama de 1,5 a 3 mg/litro. Quantidades apreciáveis também são encontradas nos vinhos brancos e rosés (JANG *et al.*, 1997; JEANDET; BESSIS; GAUTHERON, 1991).

É proposto que RSV possa ser ativo na prevenção de várias doenças, como câncer, as doenças cardíacas, diabetes tipo 2 e doenças neurodegenerativas. É provável que diferentes

mecanismos estejam envolvidos, mas a da modulação da inflamação seria o mecanismo unificador. Devido a diferentes mecanismos e alvos, deve-se supor que dose ótima dependerá da doença em particular (VANG *et al.*, 2011).

Até o momento, dados *in vitro* e *in vivo*, documentam os seguintes mecanismos de ação do RSV: modulação da proliferação celular e apoptose, modulação da angiogênese, inibição da metástase, modulação de reação redox, supressão da adipogênese e estimulação da lipólise, estimulação da osteogênese, modulação da atividade mitocondrial, supressão da inflamação, modulação de danos no DNA, modulação do metabolismo xenobiótico, modulação do metabolismo do glutamato e atividade estrogênico-antiestrogênica (VANG *et al.*, 2011).

O RSV modula a resposta inflamatória induzida por vários estímulos. Em quase todos os modelos o RSV contra-balança o níveis de marcadores bioquímicos pró-inflamatórios como TNF α , IL-1B, IL-6. Além disso, faz uma regulação negativa das enzimas proteína quimioatratante para monócitos 1 (MCP-1), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase (iNOS) durante o estímulo pró-inflamatório (VANG *et al.*, 2011). O RSV reduziu a inflamação em vários modelos animais como obesidade-induzida (RIVERA *et al.*, 2009), ratos diabéticos (ZHANG *et al.*, 2010) ou diabetes induzida quimicamente (KUMAR *et al.*, 2006). Outros modelos utilizando hipertensão induzida (CSISZAR *et al.*, 2009; INANAGA *et al.*, 2009), substâncias químicas que causam lesões teciduais no fígado (TUNALI-AKBAY *et al.*, 2010), pulmão (CSISZAR *et al.*, 2009; SENER *et al.*, 2007) e cólon (HONG *et al.*, 2010; MARTÍN *et al.*, 2006; SENGOTTUVELAN; DEEPHTA; NALINI, 2009) também demonstraram diminuição dos níveis dos marcadores inflamatórios após o uso de RSV.

2.3.1 Biodisponibilidade e farmacocinética em humanos

Os estudos mostram que o RSV é rapidamente absorvido após ingestão oral. Uma concentração plasmática máxima da substância é obtida após 30 a 60 minutos (VANG *et al.*, 2011). A meia-vida do *trans*-RSV foi 1-3 h após doses únicas e 2-5 h após administrações repetidas, e com biodisponibilidade maior após a administração matinal (ALMEIDA *et al.*, 2009). A farmacocinética do RSV, em adultos, não variou com a idade (NUNES *et al.*, 2009). Num experimento com humanos saudáveis doses únicas de 250 e 500mg de RSV aumentaram significativamente o fluxo sanguíneo cerebral após

45 minutos da ingestão, mas não alterou o desempenho cognitivo em testes padronizados (KENNEDY *et al.*, 2010).

O *trans*-RSV é rapidamente e extensamente biotransformado pelo metabolismo de primeira passagem. Vias metabólicas indetificadas incluem sulfatação e glucorinidação ácidas, contudo uma rápida sulfatação pelo intestino/figado parece ser o passo limitante da biodisponibilidade do RSV (WALLE *et al.*, 2004).

A distribuição tecidual do RSV e seus metabólitos foi estimada em estudo no qual pacientes com câncer de cólon que receberam 0,5g ou 1,0g de RSV diariamente durante oito dias antes da ressecção cirúrgica. O nível de RSV que foi encontrado no tecido colônico apresentava valores suficientes para efeitos anticarcinogênicos observados em testes *in vitro* (PATEL *et al.*, 2010).

O RSV penetra a barreira hemato-encefálica gerando efeito no sistema nervoso central. Turner *et al.* (2015), utilizando RSV na dose de 1g a 2g em pacientes com diagnóstico de doença de Alzheimer por 52 semanas, avaliou os níveis de RSV e seus metabólitos (3G-RES, 4G-RES e S-RES) no sangue e no líquido desses pacientes. Na semana 52 do uso de RSV, os níveis médios líquido do fármaco, 3G-RES, 4G-RES e S-RES foram de 3,3%, 0,4%, 0,4% e 0,3%, respectivamente, dos níveis plasmáticos. Na dosagem mais alta, foram medidos níveis em μM de RSV e os seus metabólitos no plasma, com os níveis de nM no líquido. Esses achados sugerem que alvo molecular central do RSV pode ser atingido com a concentração de nM (TURNER *et al.*, 2015). Resultados de três ensaios pré-clínicos de eficácia quimiopreventiva sugerem que repetidas doses baixas diárias de RSV (acima 2 mg/kg) são suficientes para produzir concentrações plasmáticas máximas de RSV de até 2 μM , potencialmente exercendo efeitos quimiopreventivos benéficos (GESCHER; STEWARD, 2003).

O RSV foi utilizado para reduzir o risco de desenvolvimento de câncer de cólon em animais experimentais utilizando doses entre 0,2 a 8mg/kg em ratos e 2,4 a 60mg/kg em camundongos. Aplicando os fatores de translatação de doses (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008), as "doses humanas equivalentes" diárias seriam cerca de 2mg-78mg (com base nos dados nos ratos) ou 12-290mg (com base nos camundongos) para uma pessoa de 60kg (VANG *et al.*, 2011). O aumento da sensibilidade à insulina foi observada em animais experimentais quando exposta a 2,5-400mg/kg em camundongos e 1-100mg/kg em ratos. As "doses humanas equivalentes" correspondentes seriam 12-1945mg (com base nos dados dos ratos) ou 10-973mg/dia para uma pessoa com peso de 60kg (VANG *et al.*, 2011).

2.3.2 Estudos de toxicidade do RSV em animais

Com base em estudos em animais, o RSV é geralmente bem tolerado (VANG *et al.*, 2011). Estudo com uso de RSV por pelo menos 24 meses em ratos e 18 meses em camundongos não evidenciou efeitos tóxicos (BAUR *et al.*, 2006). Em estudos com animais, exceto em doses superiores a 1g/kg por dia, não causam efeitos tóxicos. Várias experiências sub-crônicas indicam baixa toxicidade do RSV (VANG *et al.*, 2011).

Em ratos, 20m/kg/dia administrado por 28 dias não indicou toxicidade sistêmica (JUAN; VINARDELL; PLANAS, 2002). Doses orais de 300, 1000 ou 3000mg/kg/dia durante 28 dias apresentaram apenas efeitos tóxicos no grupo tratado com 3000mg, onde foi observada toxicidade renal e hepática (CROWELL *et al.*, 2004). A exposição de ratos *Wistar* a RSV (50, 150 ou 500mg/kg/dia) por quatro semanas ou três meses para 120, 300 ou 700mg/kg/dia não apresentou efeitos toxicológicos significativos, sugerindo que o RSV é bem tolerado e não tóxico (WILLIAMS *et al.*, 2009).

2.3.3 Resveratrol e estudos em humanos

Vários estudos com o uso RSV em humanos saudáveis ou com patologias tem sido realizados nos últimos anos. Essas pesquisas sugerem que o RSV é seguro e bem tolerado, e somente quando utilizado em altas doses estaria associado a efeitos adversos leves a moderados e auto-limitados, contudo, não encontramos descrição do uso em pacientes pediátricos. A Tabela 5 resume as doses e efeitos colaterais em alguns ensaios clínicos com uso de RSV, incluindo doenças neuropsiquiátricas como esquizofrenia e doença de Alzheimer.

2.3.4 Resveratrol: efeito neuroprotetor e anti-inflamatório

Vários estudos animais têm indicado que RSV tem um efeito neuroprotetor (VANG *et al.*, 2011). Este efeito foi documentado em vários modelos, incluindo coelhos, camundongos e ratos e utilizando vários métodos de avaliação como:

a) peroxidação e destruição células neuronais (ATES *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2010; MOKNI *et al.*, 2007; ROBB *et al.*, 2008; SINHA; CHAUDHARY; GUPTA, 2002; YANG; PIAO, 2003);

b) atenuação das áreas de lesão induzida (ATES *et al.*, 2006, 2007; KARUPPAGOUNDER *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2008; SAKATA *et al.*, 2010; TSAI *et al.*, 2007; YOUSUF *et al.*, 2009);

c) aumento da tolerância a lesões cerebrais (DELLA-MORTE *et al.*, 2009);

d) redução da frequência de convulsões (WU *et al.*, 2009);

e) dano na coordenação motora (BINIENDA *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2010; KIZILTEPE *et al.*, 2004; KUMAR; SHARMA, 2010; KUMAR *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2008; SINGLETON *et al.*, 2010; SINHA; CHAUDHARY; GUPTA, 2002; SÖNMEZ *et al.*, 2007);

f) melhoria da aprendizagem (KIM *et al.*, 2007; OOMEN *et al.*, 2009; RANNEY; PETRO, 2009).

2.3.5 Resveratrol e Transtorno do Espectro Autista

Considerando a associação entre a exposição ao VPA e os sintomas de TEA em humanos, sugeriu-se um modelo animal de administração de VPA pré-natal. Nos últimos anos, este modelo mostrou ser uma ferramenta de pesquisa confiável, pois apresenta muitas alterações morfológicas e comportamentais relacionadas à fisiopatologia do TEA (BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2011). Um estudo inicial do nosso grupo investigou a influência do tratamento pré-natal com RSV sobre comportamentos sociais num modelo de TEA induzido pela exposição pré-natal ao VPA. A neste trabalho a administração pré-natal de RSV evitou os prejuízos sociais induzidos pelo VPA. Foi realizada análise bioinformática para descartar possíveis interações moleculares entre VPA e RSV durante a administração, sugerindo então, que esses resultados derivam de alterações celulares e não de uma reação química isolada (BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2014) (Figura 1).

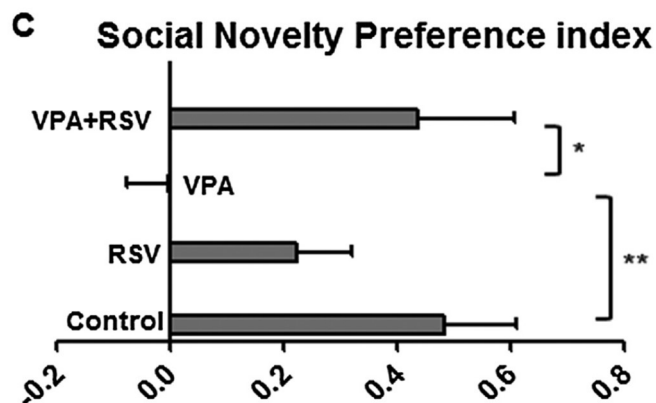
Tabela 5 - Doses e efeitos colaterais em ensaios clínicos com resveratrol.

N	Idade*	Patologia	Dose diária	Duração	Efeitos Adversos	Referências
24	32,3 ± 5,9	Sem patologia	600mg	3 dias	Inespecíficos e sem severidade. Exames laboratoriais e ECG normais.	(NUNES <i>et al.</i> , 2009)
40	24,3 ± 1,1	Sem patologia	150 a 900mg	5 dias	Cefaléia, mialgia e sonolência (leves). Exames laboratoriais e ECG normais.	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2009)
		Sem patologia e diabetes tipo 2	2,5g e 5g	28 dias	Efeitos adversos de natureza leve e reversíveis	(ELLIOTT <i>et al.</i> , 2009)
8	46	Sem patologia	4g	8 dias	Diarreia, rash cutâneo, cefaleia	(LA PORTE <i>et al.</i> , 2010)
20	66,8±17,2	Câncer de cólon	500mg e 1g	8 dias	Sem relato de efeitos adversos	(PATEL <i>et al.</i> , 2010)
19	55±2	Sem patologia	270mg	7 dias	Sem relato de efeitos adversos	(WONG <i>et al.</i> , 2011)
8	61±1,3	Obesidade	75mg	6 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(WONG <i>et al.</i> , 2013)
13	42,7±9,4	Sem patologia	1g e 2g	4 semanas	Diarreia, náuseas, cólicas, prurido, rash cutâneo e cefaleia.	(VODUC <i>et al.</i> , 2014)
120	69,8 ± 7,7	Doença de Alzheimer	0,5g a 1g	52 semanas	Sem alterações nos sinais vitais, exames físicos ou exames laboratoriais.	(TURNER <i>et al.</i> , 2015)
25	44±10,1	Esteato-hepatite não alcoólica	500mg	12 semanas	Sem relato de efeitos adversos. Exames laboratoriais sem alterações.	(FAGHIHZADEH; ADIBI; HEKMATDOOST, 2015)
60	21,5 ± 1,8	Sem patologia	100mg	90 dias	Sem relato de efeitos adversos	(MACEDO <i>et al.</i> , 2015)
45	60±7	Sobrepeso e obesidade leve	150mg	4 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(VAN DER MADE; PLAT; MENSINK, 2015)
19	46,4±11,2	Esquizofrenia	200mg	4 semanas	Sem relato de efeitos adversos ou alterações laboratoriais	(ZORTEA <i>et al.</i> , 2016)
28		Obesidade e esteato-hepatite não alcoólica	1,5g	6 meses	Relato de 1 efeito adverso grave: febre e bicitopenia	(HEEBØLL <i>et al.</i> , 2016)
72		Insuficiência renal / diálise peritoneal	150 ou 450mg	12 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(LIN; SUN; LIN, 2016)
12	27,2±1,8	Sem patologia	500mg	10 dias	Sem relato de efeitos adversos	(BEDADA; NEARATI, 2015)

N	Idade*	Patologia	Dose diária	Duração	Efeitos Adversos	Referências
16	20±0,8	Sem patologia	500mg	4 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(POLLEY <i>et al.</i> , 2016)
14	67,5±1,6	Diabetes tipo 2	1g	5 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(THAZHATH <i>et al.</i> , 2016)
21	49,1±7,4	Diabetes tipo 2 com periodontite crônica	480mg	4 semanas	Não cita	(ZARE JAVID <i>et al.</i> , 2017)
15	68,1±1,1	Sem patologia	500mg	12 semanas	Não cita	(MOVAHED <i>et al.</i> , 2016)
17	26,8±1,1	Síndrome do ovário policístico	1,5g	3 meses	Sem relato de efeitos adversos	(BANASZEWSKA <i>et al.</i> , 2016)
20	62±8	Insuficiência renal não-dialítica	500mg	4 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(SALDANHA <i>et al.</i> , 2016)
28	37,4±16,5	Colite ulcerativa	500mg	6 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(SAMSAMIKOR <i>et al.</i> , 2016)
112	32±16	Arterite de Takayasu	250mg	3 meses	Não cita	(SHI <i>et al.</i> , 2017)
17	59,2-67,3	Diabetes tipo 2	150mg	30 dias	Sem relato de efeitos adversos	(TIMMERS <i>et al.</i> , 2016)
130	64,9±8	Diabetes tipo 2	40mg e 500mg	6 meses	Sem relato de efeitos adversos maiores	(BO <i>et al.</i> , 2016)
25	57,4±10,6	Diabetes tipo 2	100mg	12 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(IMAMURA <i>et al.</i> , 2017)
42	50,5±1,4	Homens com síndrome metabólica	150mg e 1g	16 semanas	Efeitos adversos leves e temporários no grupo de dose maior	(KJÆR <i>et al.</i> , 2017)
37	61,3±1,1	Mulheres pós-menopausa	150mg	14 semanas	Sem relato de efeitos adversos	(WONG; EVANS; HOWE, 2017)
48	55±6,4	Diabetes tipo 2	800mg	2 meses	Sem relato de efeitos adversos significativos	(SEYYEDEBRAHIMI <i>et al.</i> , 2018)

*Média±DP em anos

Figura 1 - Índice de Preferência Social. Grupos experimentais: Controle (control), RSV (resveratrol), VPA (ácido valpróico) e VPA+RSV, adaptado de (BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2014)



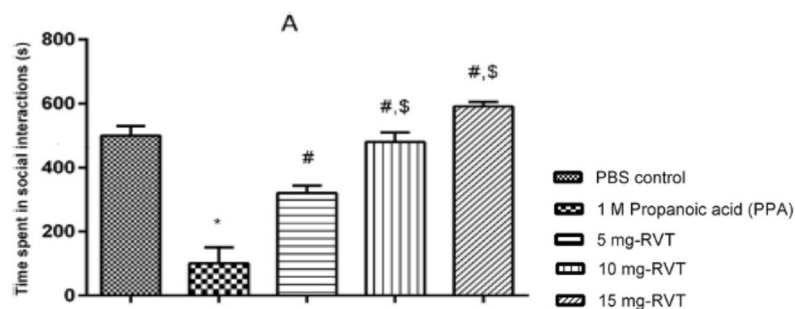
Em recentes trabalhos do nosso grupo, observou-se que além da ação preventiva comportamental do RSV no modelo VPA, ocorreu também alterações moleculares. Verificou-se que miR134-5p foi significativamente aumentado no sangue total de animais expostos ao VPA durante o período neonatal, e o RSV foi capaz de prevenir essa alteração. Neste mesmo trabalho também foi verificado um aumento de expressão dos miR134-5p e miR138-5p em crianças com TEA em relação ao controles (HIRSCH *et al.*, 2018). O RSV também reverteu alterações na sensibilidade no modelo animal de autismo por VPA, inclusive, preservando o padrão laminar cortical e a distribuição de neurônios na área somatossensorial primária e restabelecendo a proporção típica de neurônios GABAérgicos parvalbumina⁺ na amígdala (FONTES-DUTRA *et al.*, 2018).

O uso de RSV na dose de 20 mg ou 40 mg também foi investigado em outro modelo animal para TEA, modelo BTBR. Os ratos BTBR mostram uma série de anomalias imunitárias que também são observados em crianças com TEA (BAKHEET *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2009). Este modelo é caracterizado por níveis de Foxp3⁺ mais baixos e níveis mais elevados de RORγt⁺, T-bet⁺ e produção de GATA-3⁺ em células T CD4⁺ quando comparadas a outros animais. Neste estudo o RSV gerou uma indução de Foxp3⁺ e redução da expressão de T-bet⁺, GATA-3⁺ e IL-17A⁺ em CD4⁺ quando comparado com o grupo controle. Além disso, o tratamento com RSV resultou num aumento de expressão de Foxp3 mRNA e diminuição da expressão de T-bet, GATA-3, RORγt e IL-17A em tecidos esplênico e cerebral. Esses resultados sugerem o TEA está associado com a desregulação da sinalização de fatores de transcrição e que o RSV poderia corrigir essa

desregulação (BAKHEET *et al.*, 2017). Este trabalho também evidenciou que o RSV produziu uma redução significativa no comportamento repetitivo nos ratos BTBR quando comparados aos controles. Estes resultados indicam que o RSV pode reduzir o comportamento repetitivo neste modelo animal de TEA (BAKHEET *et al.*, 2017). Posteriormente, o mesmo grupo, verificou que o RSV diminuiu significativamente IL-6⁺, TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ e STAT3⁺ em células esplênicas CD4⁺ em comparação com camundongos BTBR controles. Além disso, reduziu no tecido cerebral o nível de expressão de mRNA (IL-6, TNF- α , IFN- γ , JAK1 e STAT) e expressão proteica de IL-6, IFN- γ , TNF- α , pJAK1 e pSTAT3 (Tyr705) em comparação com controles (AHMAD *et al.*, 2018b). Outro trabalho recente com o mesmo modelo animal também verificou que o RSV melhora a desregulação neuroimune através da inibição de mediadores pró-inflamatórios através das vias dos TLR e fator nuclear kappa B (NF- κ B), verificou-se que o RSV reduz a expressão proteica e de mRNA de TLR2, TLR3, TLR4, NF- κ B, iNOS e COX-2 no tecido cerebral e células esplênicas CD4⁺. Sugerindo que o RSV possa ser um novo candidato terapêutico para modular a disfunção neuroimune através da inibição de TLR, iNOS e COX-2 (AHMAD *et al.*, 2018a).

Em trabalho com outro modelo animal, este induzido por ácido propanoico, o RSV restaurou o funcionamento típico dos animais, alterando os sintomas nucleares do fenótipo autista, além de suprimir o estresse oxidativo-nitrosativo, disfunção mitocondrial, expressão de TNF- α e MMP-9 nesses animais. Neste estudo, a resposta comportamental foi dose dependente (5, 10 e 15 mg/kg), com doses maiores de RSV reduzindo mais intensamente a sintomatologia autista (BHANDARI; KUHAD, 2017) (Figura 2).

Figura 2 - Tempo de interação social. (RVT – resveratrol), adaptado de (BHANDARI; KUHAD, 2017)



2.4 MICRORNA

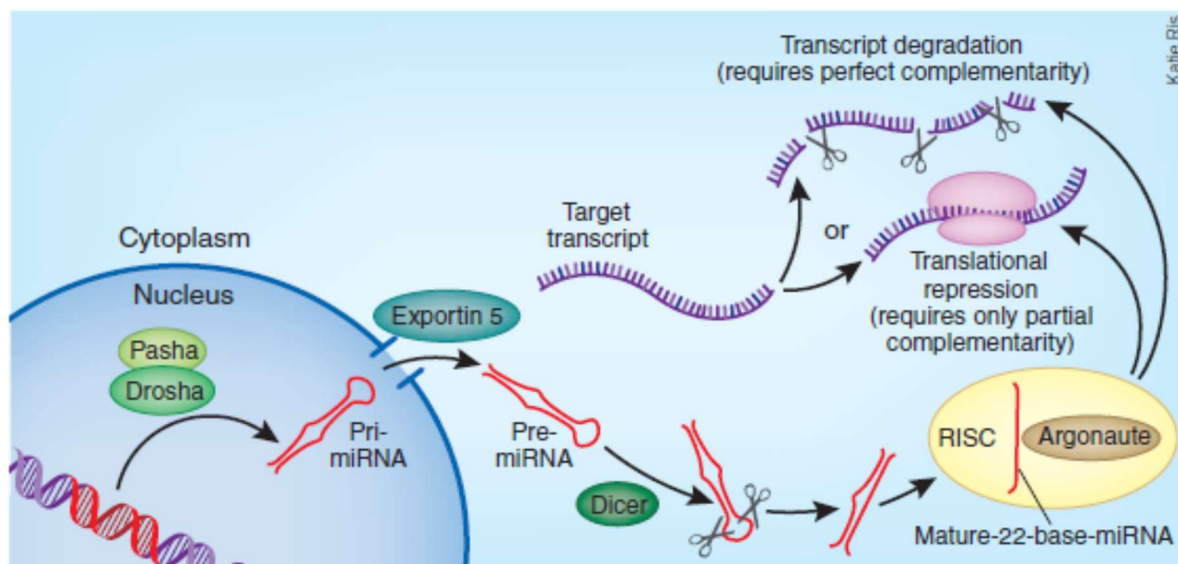
MicroRNA refere-se a um grupo de pequenos RNA não-codificantes, compreendendo cerca de 22 nucleotídeos. Por emparelhamento de bases com RNA mensageiro (RNAm), os miRNA controlam a tradução de proteínas a partir dos transcritos (CHEN; RAJEWSKY, 2007), figura 3. Os miRNA foram caracterizados pela primeira vez no início da década de 1990 (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), mas seu papel como uma categoria específica de reguladores biológicos com funções conservadas não foi totalmente realizado até uma década depois (KAMAL; MUSHTAQ; GREIG, 2015). Os miRNA estão possivelmente envolvidos em quase todos os processos biológicos, por modular a expressão proteica via mRNA (KAMAL; MUSHTAQ; GREIG, 2015), figura 4. Os miRNA estão envolvidos em múltiplos estágios do desenvolvimento cerebral como proliferação de células-tronco neurais, diferenciação, migração, formação de complexidade dendrítica e crescimento axonal, além de terem ações na manutenção da função do SNC ao longo da idade adulta (BELZEAUX; LIN; TURECKI, 2017; BLANDFORD; GALLOWAY; MOORE, 2018).

Níveis alterados de alguns miRNA têm sido implicados em várias desordens do sistema nervoso central, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica (QIU; TAN; ZENG, 2015), doença de Huntington (HOSS *et al.*, 2014), esquizofrenia (YIN *et al.*, 2014) e TEA (GEAGHAN; CAIRNS, 2015; MOR *et al.*, 2015).

Muitos miRNA podem atuar diretamente na modulação de processos imunológicos, incluindo processos inflamatórios no SNC (SUN *et al.*, 2018; XIAOYAN *et al.*, 2017). Estudos em modelos animais verificaram que durante o acidente vascular cerebral, o aumento da expressão dos miR-424 e miR-let-7c-5p gera inibição da ativação astrocitária reduzindo o volume do infarto e melhorando a função neurológica (NI *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2013). Outros trabalhos em modelos de isquemia cerebral também demonstraram que aumento da expressão dos miR-22 e miR-122 ou a redução do miR-15a/16-1 diminui os níveis de TNF- α , IL-6, MCP-1, COX-2 e iNOS e expressão do gene VCAM-1 (LIU *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2015). Já em modelos para trauma craniocéfálico e medular, o miR-124-3p inibe a inflamação tecidual (HUANG *et al.*, 2018) enquanto os miR-27a, miR-199b, miR-124, miR-497 e miR-133b reduzem a ativação de astrócitos/macrófagos e inibem as vias NF- κ B/IL-1 β ou I κ B kinase β -NF-

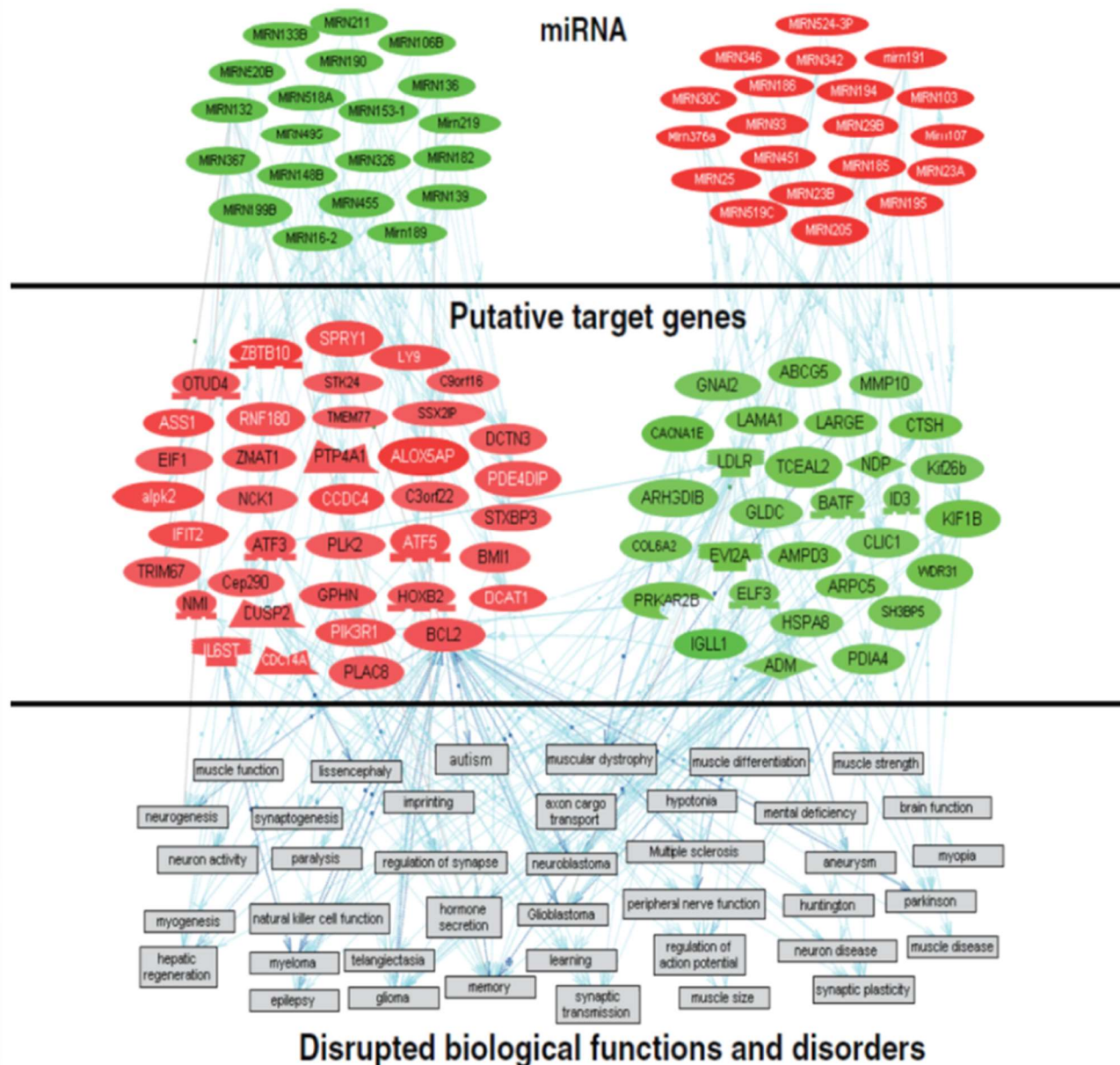
κ B, reduzindo o processo inflamatório (LI *et al.*, 2015; LOUW *et al.*, 2016; THEIS *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2016).

Figura 3 - Biogênese dos miRNA. Após transportado para o citoplasma o pré-miRNA é clivado em miRNA e acoplado ao complexo silenciador RNA induzido (RISC), que por sua vez liga-se ao mRNA, podendo interferir na sua tradução ou leva-lo à degradação. Fonte: (MACK, 2007).



Evidências crescentes indicam que a neuroinflamação desempenha um papel crucial na patogênese da epilepsia do lobo temporal, e estudos em tecido cerebral de humanos e modelos animais evidenciam que existe um aumento de expressão do miR-146a modulando esse processo (HE *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018; OMRAN *et al.*, 2012). Na doença de Alzheimer, os níveis de expressão do miR-146a aumentaram com gravidade da doença, e foram particularmente elevados nas regiões do cérebro com achado neuropatológicos de inflamação (LUKIW *et al.*, 2011). Já o miR-132, alterado tanto no autismo quanto na esquizofrenia, participa dos processos ligados à plasticidade cerebral, à conectividade e regulação das respostas imunes (MELLIOS; SUR, 2012). O miR-146a pode desempenhar um importante papel na inflamação mediada por astrócitos (IYER *et al.*, 2012). Além disso, o miR-155 tem sido relatado como modulador a resposta inflamatória na micróglia (CARDOSO *et al.*, 2012). Outros microRNA com importante papel na inflamação, além do miR-1461 e do miR155 são: miR-132, miR-21, Let-7, miR-223, miR-181b, miR-9, miR-147, miR-17, miR-18, miR-19, miR-301, miR-26, miR-23, miR-24, miR-27, miR-203, miR-126, miR-302, miR-340, miR-1246, miR-34, miR-221, miR-222, miR-320a, miR-674, miR-33, miR-10a e miR-145 (NEJAD; STUNDEN; GANTIER, 2018).

Figura 4 - Exemplo de rede/relações entre miRNA, genes-alvo potenciais, funções biológicas e doenças implicadas pelos genes alvo. Em vermelho genes e miRNA com aumento de expressão. Em verde genes e miRNA com redução de expressão. Fonte: (SARACHANA *et al.*, 2010).



2.4.1 MicroRNA e TEA

Até o presente momento, a maioria dos estudos centraram-se mais em miRNA e fatores genéticos, com poucos estudos investigando a relação do miRNA com fatores epigenéticos envolvidos no TEA (KAMAL; MUSHTAQ; GREIG, 2015; KICHUKOVA

et al., 2017). Fatores epigenéticos regulam a função ou atividade do gene, sem alterar sua sequência de DNA (KICHUKOVA *et al.*, 2017).

Os miRNA que já foram descritos com alteração no TEA encontram-se na Tabela 6. Em um estudo de caso-controle, Abu-Elneel *et al.* (2008) rastrearam a expressão de 466 miRNA humanos no córtex cerebelar *post-mortem* de 13 indivíduos com TEA e igual número de indivíduos neurotípicos. Um total de 28 miRNA apresentaram expressão diferente em pelo menos uma das amostras de indivíduos com TEA em comparação com os indivíduos com desenvolvimento normal (ABU-ELNEEL *et al.*, 2008). No entanto, nenhum miRNA específico foi uniformemente desregulado em todo este conjunto de amostras *post-mortem*. Um estudo de 2008 avaliou o perfil de 470 miRNA em linfócitos de 6 indivíduos com TEA em comparação com indivíduos neurotípicos pareados. Os autores descrevem expressão alterada de nove miRNA nas amostras de indivíduos com TEA (TALEBIZADEH; BUTLER; THEODORO, 2008). Outro estudo também utilizando linfócitos encontrou 43 miRNA diferentemente expressos nos pacientes com TEA em relação aos indivíduos com desenvolvimento típico (SARACHANA *et al.*, 2010). Um recente trabalho usando amostras de soro de 55 indivíduos com TEA e 55 indivíduos controles pareados por idade e sexo identificou 13 miRNA que foram diferencialmente expressos em indivíduos com TEA (MUNDALIL VASU *et al.*, 2014). Estudo chinês com 15 pacientes e 15 controles encontrou diferença significativa na expressão de 5 microRNA com expressão aumentada em relação aos controles (HUANG *et al.*, 2015). Outro estudo com 30 crianças com TEA de ambos os sexos e 30 controles saudáveis encontrou diferenças entre o perfil de expressão de microRNA no soro (KICHUKOVA *et al.*, 2017).

2.4.2 MicroRNA e Biomarcadores

Uma vez que um único miRNA pode regular uma miríade de transcritos e assim atuar como um regulador de diversos processos, um subconjunto de miRNA poderia ser utilizado como biomarcador de estados fisiológicos e patológicos. Um estudo demonstrou que a expressão de apenas dois miRNA poderia discriminar com precisão uma leucemia linfóide aguda de uma leucemia mieloide aguda (MI *et al.*, 2007), reforçando a potencialidade dos miRNA como biomarcadores. Outras características que tornam os

miRNA excelentes candidatos para estudos de biomarcadores são: notável estabilidade e resistência à degradação, especialmente em comparação com o RNAm (KICHUKOVA *et al.*, 2017); estabilidade em diferentes fluidos corporais; envolvimento na patogênese das patologias; e detecção no início da doença (STOICEA *et al.*, 2016).

Os miRNA na forma de biomarcadores, além da participação no diagnóstico, poderiam ajudar a identificar indivíduos mais propensos a responder a terapêuticas específicas e fornecer mais objetividade na tomada de decisão no tratamento (BELZEAUX; LIN; TURECKI, 2017). Outra perspectiva é criação de novas estratégias terapêuticas utilizando os miRNA como alvos, gerando mudanças na sinalização dos processos nos quais esses microRNA estejam envolvidos (BLANDFORD; GALLOWAY; MOORE, 2018; SUN *et al.*, 2018).

O uso de perfis de miRNA como biomarcadores para patologias tem recebido atenção significativa nos últimos anos (BLANDFORD; GALLOWAY; MOORE, 2018) com trabalhos em patologias como asma na infância (KHO *et al.*, 2018), câncer de pâncreas (GUO *et al.*, 2018), insuficiência cardíaca (SIASOS; TSIGKOU; TOUSOULIS, 2018), doença de Fabry (CAMMARATA *et al.*, 2018), depressão (BELZEAUX; LIN; TURECKI, 2017), esclerose múltipla (MANNA *et al.*, 2018; REGEV *et al.*, 2016), tumores do SNC (A *et al.*, 2018; KOPKOVA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2014), acidente vascular encefálico (JICKLING *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2009) e doença de Alzheimer (DENK; JAHN, 2018; PUTTEERAJ; FAIRUZ; TEOH, 2018).

Como a amostragem do tecido cerebral em vida em seres humanos não é prático para a maioria das doenças neurológicas, investigadores tem usado sangue, plasma, líquido cefalorraquidiano e saliva como fontes acessíveis de RNA para realizar estudos de perfis de miRNA com expressão em doenças do SNC (HICKS *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018).

Tabela 6 - MicroRNA com expressão alterada em sujeitos com TEA.

Amostra Biológica	MicroRNA	Expressão	Amostra N	Autor
Linfócitos	miR-132, miR-146a, miR-146b, miR-23a, miR-23b, miR-663	Aumentada	6	TALEBIZADE H, Z. <i>et al.</i> 2008.
	miR-92 (a1-a2), miR-320, miR-363	Reduzida		
	miR-185, miR-103, miR-107, miR-29b, miR-194, miR-524, miR-191, miR-376a-AS, miR-451, miR-23b, miR195, miR-342, miR-23a, miR-186, miR-25, miR-519c, miR-346, miR-205, miR-30c, miR-93, miR-186, miR-106b	Aumentada	14	SARACHANA, T. <i>et al.</i> 2010.
	miR-182-AS, miR-136, miR-518a, miR-153-1, miR-520b, miR-455, miR-326, miR-199b, miR-211, miR-132, miR-495, miR-16-2, miR-190, miR-219, miR-148b, miR-189, miR-133b, miR-106b, miR-367, miR-139	Reduzida		
miR-199b-5p, miR-548o, miR-577, miR-486-3p, miR-455-3p, miR-338-3p, miR-199a-5p, miR-650, miR-486-5p, miR-125b, miR-10a, miR-196a	Aumentada	20	GHAHRAMAN I SENO, M. M. <i>et al.</i> 2011.	
Soro	miR-101-3p, miR-106b-5p, miR-130a-3p, miR-195-5p, miR-19b-3p	Aumentada	55	MUNDALIL VASU, M. <i>et al.</i> 2014.
	miR-151a-3p, miR-181b-5p, miR-320a, miR-328, miR-433, miR-489, miR-572, miR-663a	Reduzida		
	miR-365a-3p, miR-619-5p, miR-664a-3p	Aumentada	30	KICHUKOVA <i>et al.</i> , 2017
	miR-3135a, miR-328-3p, miR-197-5p, miR-500a-5p, miR-424-5p	Reduzida		
Córtex cerebelar	miR-484, miR-21, miR-212, miR-23a, miR-598, miR-95, miR-129, miR-43, miR-7, miR-15a, miR-27a, miR-15b, miR-148b, miR-132, miR-128, miR-93	Aumentada	13	ABU-ELNEEL, K. <i>et al.</i> 2008.
	miR-93, miR-106a, miR-539, miR-652, miR-550, miR-432, miR-193b, miR-181d, miR-146b, miR-140, miR-381, miR-320a, miR-106b	Reduzida		
Cérebro	miR-142-5p, miR-142-3p, miR-451a, miR-144-3p	Aumentada	12	MOR, M. <i>et al.</i> 2015.
Sangue	miR-34b	Reduzida	15	HUANG <i>et al.</i> , 2015.
	miR-let-7a, miR-let-7d, miR-103a, miR-1228	Aumentada		
	miR134-5p, miR138-5p	Aumentada	7	HIRSCH <i>et al.</i> , 2018
Saliva	miR-628-5p, miR-127-3p, miR-335-3p, miR-2467-5p, miR-28-5p, miR-191-5p, miR-3529-5p, miR-218-5p, miR-7-5p, miR-140-3p	Aumentada	24	HICKS, S. D. <i>et al.</i> 2016.
	miR-27a-3p, miR-30e-5p, miR-23-3p, miR-32-5p	Reduzida		

2.4.3 Expressão de MicroRNA na saliva

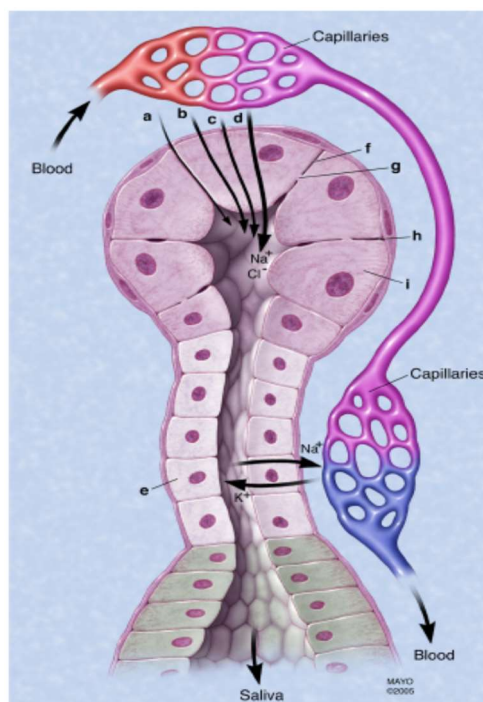
A saliva é gerada dentro das glândulas salivares por células acinares, coletada em pequenos canais e, posteriormente, liberada para a cavidade oral. As três glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) contribuem com 90% do total de saliva. Cada glândula salivar (Figura 5) é altamente permeável e envolta por capilares, o que permite a livre troca de moléculas do sangue para as células acinares adjacentes (YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

Investigadores postulam que as moléculas derivadas do sangue entram nos tecidos salivares via transcelular (por exemplo, transporte passivo e ativo) ou paracelular (por exemplo, a ultrafiltração extracelular) (DROBITCH; SVENSSON, 1992; HAECKEL; HÄNECKE, 1993; JUSKO; MILSAP, 1993). Isto sugere que a absorção pelas glândulas salivares de biomarcadores circulantes de doenças sistêmicas poderiam, possivelmente, alterar a composição bioquímica das secreções salivares. Conseqüentemente, fluidos orais podem conter informações moleculares capazes de informar sobre o estado atual de saúde do indivíduo (YOSHIZAWA *et al.*, 2013). A maioria dos miRNA detectáveis no soro e na saliva está concentrada em exossomas. Os exossomas são microvesículas com cerca de 30-100 nm de tamanho, e são segregadas por uma variedade de tipos de células, tais como células epiteliais, linfócitos T e B, mastócitos, células dendríticas e neurônios (BLANDFORD; GALLOWAY; MOORE, 2018; GALLO *et al.*, 2012).

O transporte extracelular de miRNA através exossomas e outras microvesículas é um mecanismo epigenético estabelecido, através da qual as células podem alterar a sua expressão gênica própria e das células ao seu redor (HICKS *et al.*, 2016). Para que isso ocorra, o miRNA vesicular é liberado para o espaço extracelular e posteriormente penetra nas células vizinhas para então bloquear a tradução do RNAm em proteínas (HU; DRESCHER; CHEN, 2012). A natureza extracelular deste processo permite a medição do material genético do sistema nervoso central através do recolhimento simples de saliva (GALLO *et al.*, 2012; HICKS *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018).

Este método através da coleta de saliva minimiza muitas limitações associadas às outras técnicas, como a análise do tecido cerebral *post-mortem* (lesão cerebral anóxica e degradação de RNA), leucócitos periféricos (relevância de mudanças de expressão) ou soro (punção dolorosa para coleta de sangue) (HICKS *et al.*, 2016).

Figura 5 - Mecanismo de transporte de moléculas do plasma para os ductos salivares. A imagem demonstra a proximidade da glândula com os sistema vascular. As glândulas salivares são muito vascularizadas, o que permite passagem de constituintes do sangue. As células acinares das glândulas absorvem moléculas presentes na corrente sanguínea e secretam na cavidade oral. Alterações na constituição do sangue podem posteriormente alterar a constituição da saliva. Biomarcadores presentes no sangue também estariam alterados na saliva, permitindo o diagnóstico de patologias sistêmicas com coleta de secreções salivares. Adaptado de (YOSHIZAWA *et al.*, 2013).



A utilização de saliva para a detecção de doenças orais tem sido amplamente demonstrada (CHENG; REES; WRIGHT, 2014). Estudos para detecção de tumores de cabeça e pescoço (SALAZAR *et al.*, 2014) e pâncreas (HUMEAU *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2015) também têm sido descritos, inclusive com o uso do termo “biópsia líquida” (KAI; DITTMAR; SEN, 2018). E o interesse por biomarcadores salivares para doenças neuropsiquiátricas tem aumentado nos últimos anos, incluindo patologias como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (FARAH *et al.*, 2018).

Estudo de 2016 utilizando saliva como amostra biológica de 24 crianças com diagnóstico de TEA encontrou uma diferença na expressão de 14 miRNA nesses sujeitos em comparação aos controles. Além disso, este trabalho revelou correlações significativas entre desempenho na escala VABS e a expressão de 13 desses 14 miRNA. Notavelmente, nove dos miRNA demonstraram apenas aspecto negativo nas correlações (isto é, maior expressão do miRNA foi associada com menor escore na escala VABS), enquanto quatro

deles apresentaram apenas correlação positiva. Os miRNA com correlações positivas às pontuações na VABS apresentaram uma expressão reduzida nos indivíduos com TEA, ao passo que cada miRNA com correlações negativas para pontuações na VABS tinham uma expressão aumentada no TEA (HICKS *et al.*, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

O TEA é um distúrbio crônico e na maioria das vezes com graves prejuízos no funcionamento cognitivo, emocional e comportamental. A maioria dos pacientes apresenta déficit cognitivo moderado ou grave, e não adquirem capacidade de viver de forma independente. A prevalência do TEA o torna uma das desordens do desenvolvimento neurológico mais frequente, representando uma grande preocupação de saúde pública, gerando altos custos econômicos para a sociedade e grande sofrimento para a família. Seu diagnóstico precoce, além de aliviar as preocupações prolongadas das famílias, acelera oportunidades de beneficiar a criança com intervenções especializadas.

Atualmente não existem marcadores genéticos ou bioquímicos para o TEA e não há nenhum tratamento capaz de reverter completamente seus sintomas, sendo necessária a busca por novas abordagens diagnósticas e terapêuticas que modifiquem a história natural da doença. Os trabalhos preliminares sugerem que as respostas neuroimunes anormais poderiam ser alvos adequados para intervenção farmacológica e servirem de biomarcadores para o TEA

Para fins de logística, o trabalho foi dividido em dois projetos, ambos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

ARTIGO 2 – USO DE RESVERATROL EM SUJEITOS DE PESQUISA PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.

ARTIGO 3 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNA EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.

4 OBJETIVOS RELACIONADOS AO ARTIGO 2: USO DE RESVERATROL EM SUJEITOS DE PESQUISA PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

4.1 OBEJTIVO GERAL

Avaliar o efeito do Resveratrol na dose de 200mg/dia nos sintomas do Transtorno do Espectro Autista (interação social, comunicação e comportamentos restritos e estereotipados) em sujeitos pediátricos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar tolerabilidade do uso do resveratrol;
- b) Avaliar os possíveis efeitos adversos do resveratrol.
- c) Avaliar as possíveis alterações laboratoriais causadas pelo resveratrol.
- d) Avaliar a expressão de microRNA de interesse em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) pré e após uso de resveratrol.

5 METODOLOGIA RELACIONADA AO ARTIGO 2: USO DE RESVERATROL EM SUJEITOS DE PESQUISA PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo terapêutico piloto (Fase I/II), na forma de ensaio clínico aberto, para prova de conceito, monocêntrico, em sujeitos com diagnóstico de TEA de 10 a 18 anos de idade.

5.2 AMOSTRA

A amostra foi obtida por conveniência. A pesquisa foi divulgada no ambulatório de TEA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por meio de cartazes. A seleção seguiu a ordem de inscrições, incluindo no estudo os 5 primeiros voluntários em acordo com os critérios de seleção.

5.2.1 Critérios de Inclusão

- a) Diagnóstico de TEA de acordo com os critérios do DSM-5, confirmado pelo julgamento do investigador;
- b) Idade entre 10 e 18 anos;
- c) Sujeitos em uso de tratamento psicofarmacológico considerado adequado pelo investigador, em dose estável por no mínimo 4 semanas antes da inclusão, sem necessidade de adequação da dose ao longo do estudo;

5.2.2 Critérios de Exclusão

- a) Presença de síndromes associadas ao TEA, como a seguir: diagnóstico de Síndrome de X frágil, Síndrome de Rett, Síndrome de Angelman, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Smith-Lemli-Opitz e Esclerose Tuberosa;
- b) Início de nova medicação ou interrupção de medicamento prévio que possa gerar alteração comportamental (exemplo, Risperidona) causando fator de confusão com RSV.
- c) Necessidade modificação na rotina (exemplo, mudança de endereço, terapias ou medicações) que possa gerar fator de confusão com RSV;
- d) Estar em uso de anticonvulsivantes;
- e) Apresentar doença sistêmica em atividade (como cardiopatia, hepatopatia, nefropatia);

- f) Qualquer condição que, no parecer do investigador, colocaria a segurança do sujeito em risco após a exposição à substância em estudo;

Optou-se pela idade de inclusão mínima de 10 anos pela maior facilidade de administração do medicamento, já que a apresentação do RSV é em cápsulas e crianças menores poderiam ter dificuldade de deglutição. Além disso, aos 10 anos as crianças apresentam uma massa corporal mais próxima ao de adultos, facilitando cálculo da dose.

5.3 INTERVENÇÃO

Os sujeitos receberam RSV na dose de 200mg/dia (duas cápsulas de 100mg em tomada única diária pela manhã) por 90 dias. O RSV utilizado apresenta níveis de pureza adequados para ensaios clínicos (99% *trans*-RSV, Farmácia Reativa, Porto Alegre, RS).

Optou-se pela dose de 200mg ao dia por três fatores:

- 1) Resultados de três ensaios pré-clínicos de eficácia quimiopreventiva sugerem que repetidas doses baixas diárias de RSV (acima 2 mg/kg) são suficientes para produzir concentrações plasmáticas máximas de RSV de até 2 μ M (GESCHER; STEWARD, 2003).
- 2) Aplicando os fatores de translatação de doses (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008), as "doses humanas equivalentes" diárias. para quimioproteção, seriam cerca de 2mg-78mg (com base nos dados nos ratos) ou 12-290mg (com base nos camundongos) para uma pessoa de 60kg (VANG *et al.*, 2011).
- 3) Estudos em adultos utilizando 200mg ao dia sugerem segurança dessa dosagem.

5.4 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 esquiva social; III - comportamento estereotipado; IV - hiperatividade; V - fala inapropriada;
- c) possíveis efeitos adversos;
- d) expressão de miRNA (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-199-5p, hsa-miR-218-5p);

5.5 DESFECHO ESPERADO

Espera-se como desfecho da intervenção uma diminuição dos escores dos instrumentos utilizados na avaliação dos sintomas do TEA e modificação na expressão dos miRNA de interesse.

5.6 FERRAMENTAS DE PESQUISA

Clinical Global Impression (CGI) (Impressão Clínica Global):

Escala simples, de fácil aplicação, respondida pelo pesquisador, universalmente reconhecida e utilizada em estudos terapêuticos com pacientes com desordens mentais (GUY W, 1976), Anexo B. Apresenta 2 componentes:

-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). Esta escala será aplicada apenas na primeira visita a fim de caracterização da amostra.

-CGI-I: *Clinical Global Impression – Improvement Scale*: avalia a melhora global desde o início do tratamento, com escores variando de 1 (muito melhor) a 7 (muito pior);

Aberrant Behavior Checklist (ABC) (Lista de Checagem de Comportamento):

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

A escala ABC apresenta 58 itens divididos em 5 subescalas:

I – irritabilidade, agitação e choro (15 itens);

II – letargia e esquiva social (16 itens);

III – comportamento estereotipado (7 itens);

IV – hiperatividade (16 itens);

V – fala inapropriada (4 itens)

A escala é acompanhada por um cabeçalho que deve ser preenchido com as seguintes informações: Características demográficas (idade, sexo, grau de retardo), qualquer diagnóstico médico ou psiquiátrico, uma lista das medicações em uso. Em seguida há uma folha de respostas na qual a pontuação deve ser descrita nas subescalas, para acompanhar a evolução do paciente em todos os cinco fatores avaliados no decorrer do tratamento. Para cada item há as seguintes opções de pontuação: 0- não é problema; 1- o comportamento é um problema, mas em grau leve; 2- o problema tem gravidade moderada; 3- o problema é grave (AMAN *et al.*, 1985; LOSAPIO *et al.*, 2011).

5.7 EXTRAÇÃO DE MICRORNA

Coleta de PBMCs

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram coletadas a partir de 5 ml de sangue periférico retirado de cada indivíduo por venopunção em tubos de EDTA e isoladas por gradiente de densidade (Histopaque 1,077 g/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) de acordo com as instruções do fabricante.

O sangue total foi centrifugado a 1200 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. O plasma foi retirado e imediatamente armazenado em TRIzol® (1:2). O sangue foi reconstituído com PBS no mesmo volume de plasma retirado. O sangue anticoagulado reconstituído foi depositado sobre o Histopaque-1077 e centrifugado a 400

g (rcf) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os linfócitos e outras células mononucleares permanecem na interface plasma/Histopaque 1,077. As PBMCs foram aspiradas, transferidas para um tubo de centrífuga cônico limpo e lavadas com solução isotônica de salina tamponada com fosfato (PBS). Após nova centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, o sedimento contendo as células foi ressuspensão em PBS e as células foram ressuspensas para contagem. As PBMCs purificadas foram marcadas com azul de tripan (1:10) e contadas manualmente com um hemocítômetro. As células foram também imediatamente armazenadas em TRIzol®.

Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa (RT-qPCR)

O RNA total das amostras de plasma foi isolado usando QIAzol® (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada de acordo com (CHEN *et al.*, 2005). Foi adicionado 1.25 mM de 20 *primers stem-loop* (U6, RNU6, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-199-5p, hsa-miR-218-5p) ao mix contendo RNA, oligo(dT)25V (5 mM), 250 mM de dNTPs (Ludwig, RS, Porto Alegre, Brasil) e água livre de RNase para um volume total de 17 ml seguido de uma incubação a 65°C por 5 minutos e resfriamento em gelo. A enzima MML-V RT (New England Biolabs, MA, USA) foi usada para a síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante. Cada mix de reação foi incubado a 16°C por 30 minutos seguido de outros 30 minutos a 42°C. Todas as amostras de cDNA foram diluídos 50 vezes em água livre de RNase. Os *primers stem-loop*, *primers* de iniciação e o *primer* universal reverso foram desenhados de acordo com (CHEN *et al.*, 2005). Todas as sequências dos *primers* são apresentadas na Tabela 7.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real foi realizada no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX384 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O PCR foi realizado no volume de 10 µL contendo 5 µL de cDNA diluído (1:50), 1× SYBR Green I (Invitrogen, CA, USA), 0.1mM de dNTPs, 1× Tampão de PCR, 3mM MgCl₂, 0.25U de Taq DNA

Polimerase (Quatro G, RS, Porto Alegre, Brazil) e 200 nM de cada *primer* de iniciação e reverso. Amostras foram analisadas em triplicatas biológicas em placa de 384 poços, e, um controle foi incluído. Os genes de referência foram escolhidos de acordo com o software GeNorm para determinar o número de miRNA necessários para normalização e para identificar os miRNA mais pcr foram setadas como segue: uma etapa inicial de ativação da polimerase por 5 min. a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 10 segundos a 60 °C para anelamento e 10 segundos a 72 °C para alongamento. A análise da curva de *melting* foi programada ao fim da corrida de PCR no intervalo de 65 a 95 °C, e a temperatura aumentou gradualmente em 0.4 °C. O limite e as linhas de base foram determinados manualmente usando o software do gerenciador Bio-Rad CFX. Para calcular a expressão relativa dos miRNA foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O teste t de Student foi realizado para comparar as diferenças de expressão entre as diferentes amostras. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

Tabela 7 - Sequência de *primers* dos 19 miRNA avaliados, incluindo *primers* de iniciação, RT stem-loop e um universal reverso.

miRNA ID	Sequências de miRNA	Tipo de <i>primer</i>	Sequências de <i>primers</i>
miR132-3p	uaacagucucagccauggucg	Iniciação	TCC GGC TAA CAG TCT ACA GCC A
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC cgacca
miR138-5p	agcugguguugugaaucaggccg	Iniciação	TCC GGA AGC TGG TGT GAA TC
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC cggect
miR125a-5p	ucccugagaccuuuaaccuguga	Iniciação	GTC GCG ATC CCT GAG ACC CTT TA
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC tcacag
miR195-5p	uagcagcacagaaauuuggc	Iniciação	GGG CGC TAG CAG CAC AGA AAT A
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC gccaat
miR199a-5p	cccaguguucagacuaccuguuc	Iniciação	GAT GCG CCC AGT GTT CAG ACT
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC gaacag

miR134-5p	ugugacugguugaccagagggg	Iniciação	GGC TCT TGT GAC TGG TTG ACC A
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC ccctc
miR124-3p	uaaggcacgcgugaaugcc	Iniciação	CTA GCT TAA GGC ACG CGG TGA
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC ggcatt
miR181a-5p	aacauucaacgcugucggugagu	Iniciação	GCG CTG AAC ATT CAA CGC TGT C
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC actcac
miR181b-5p	aacauucauugcugucgguggu	Iniciação	GCT GCG CAA CAT TCA TTG CTG TC
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC acccac
miR25-3p	cauugcacuugucucggucuga	Iniciação	TCA GCA CAT TGC ACT TGT CTC GG
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC tcagac
miR21-5p	uagcuuauacagacugauguuga	Iniciação	CCG GCG CTA GCT TAT CAG ACT GAT
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC tcaaca
miR23a-3p	aucacauugccagggauuucc	Iniciação	GCT GTC ATC ACA TTG CCA GGG A
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC ggaat
miR146a-5p	ugagaacugaaauccauggguu	Iniciação	CGT GGC GTG AGA ACT GAA TTC CA
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC aacca
miR218-5p	uugugcuugaucuaaccaugu	Iniciação	GCC GTC CTT GTG CTT GAT CTA ACC
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC acatgg
miR30c-5p	uguaaacaucacuacucucagc	Iniciação	GCG TCG CTG TAA ACA TCC TAC ACT C
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC gctgag
miR191-5p	caacggaaucacaaaagcagcug	Iniciação	GGA GCG TCA ACG GAA TCC CAA AAG
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC cagetg

miR106b-5p	uaaagugcugacagugcagau	Iniciação	GGG CGC TAA AGT GCT GAC AGT
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC atctgc
miR145-5p	guccaguuuuccaggaaucccu	Iniciação	TTG GAG GTC CAG TTT TCC CAG GA
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC agggat
U6	augagugcucgcuucggca	Iniciação	ATG AGT GCT CGC TTC GGC A
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC aaaata
RNU6B	acgtacgaaggatgacacgc	Iniciação	ACG TAC GCA AGG ATG ACA CGC
		RT stem-loop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC aaaat
REVERSE UNIVERSAL		Iniciação	5'-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3'

5.8 LOCAL DE REALIZAÇÃO

As escalas e as coletas de sangue foram realizadas no Centro de Pesquisas Clínicas (CPC) do HCPA. As análises laboratoriais foram realizadas pelo Laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a análise de expressão dos miRNA e interleucinas no Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica – UFRGS.

5.9 LOGÍSTICA

Um dia antes do início do tratamento com RSV foi aplicada as escalas (CGI e ABC) para avaliação comportamental e coletado sangue por punção de veia periférica para exames laboratoriais e avaliação da expressão de miRNA.

Após 45 dias de uso de RSV, novamente houve a coleta de sangue e entrevista com os pais para verificar possíveis efeitos colaterais.

No 90º dia, foi realizada a terceira entrevista com os responsáveis e coletado nova amostra de sangue.

A seleção dos participantes do estudo, a distribuição da medicação, a aplicação de escalas e a avaliação clínica dos pacientes em todos os momentos foram realizadas pelo mesmo pesquisador.

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.

Para fins de controle de adesão, o número de cápsulas era contabilizado no dia de aplicação de escalas pelo pesquisador.

5.10 ASPECTOS ESTATÍSTICOS

5.10.1 Cálculo do tamanho da amostra

Como se tratava de um estudo piloto para prova de conceito e não existiam dados de segurança do uso de RSV em crianças, optou-se por sua administração em número reduzido de sujeitos, sem cálculo de tamanho amostral.

5.10.2 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 21.0, 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 valores de expressão dos miRNA, foi utilizado o teste t de *Student* para amostras emparelhadas. Na comparação das médias de valores da escala ABC foram usados o teste t de *Wilcoxon* e para o cálculo do tamanho do efeito foi utilizado a fórmula *d* de *Cohen*, ajustada para n menor que 50. Para significância estatística, foi considerado um valor de p igual ou menor a 0,05.

5.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (registro no Grupo de Pesquisas do HCPA – 17-0132). Os pais e/ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Apêndice A. O estudo foi cadastrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC), registro 6356 e na *International Clinical Trials Registry Platform - World Health Organization* (WHO), Número Universal do Ensaio U1111-1213-6255.

Esta investigação encontra-se adequadamente alicerçada em normas e conhecimentos cientificamente consagrados em experiências laboratoriais, *in vitro* e conhecimento da literatura pertinente, conforme apresentado na revisão da literatura.

O protocolo seguiu todos os aspectos éticos e metodológicos da Resolução 466/2012 - 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.

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 RSV após o período preconizado.

6 OBJETIVOS RELACIONADOS AO ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNA EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

6.1 OBEJTIVO GERAL

Avaliar o padrão de expressão de um conjunto de miRNA relacionados ao TEA e sistema inflamatório em sujeitos pediátricos em comparação com seus respectivos controles.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o perfil de expressão de miRNA na saliva de sujeitos pediátricos com diagnóstico de TEA e sujeitos com desenvolvimento normal.
- b) Buscar, em banco de dados online, possíveis alvos para miRNA alterados.

7 METODOLOGIA RELACIONADA AO ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNA EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

7.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo transversal, caso-controle, monocêntrico, em sujeitos pediátricos com diagnóstico de TEA com idade de 3 a 18 anos e controles com desenvolvimento normal.

7.2 AMOSTRA

A amostragem foi por conveniência e proveniente do ambulatório de TEA da Unidade de Neuropediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para os casos e da Ambulatório de Pediatria e Cirurgia Pediátrica para os controles.

Os indivíduos controles tiveram avaliação de desenvolvimento normal para fazerem parte do estudo e foram pareados por idade e sexo. A avaliação do desenvolvimento foi realizada pelo neuropediatra pesquisador que obteve as amostras de saliva. Somente foram selecionados os controles com desenvolvimento compatível com a idade cronológica e sem patologias que pudessem gerar distúrbios do comportamento.

7.2.1 Critérios de Inclusão

- a) Diagnóstico de TEA de acordo com os critérios do DSM-5, confirmado pelo julgamento do investigador;
- 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);

7.2.2 Critérios de Exclusão

- a) Presença de patologias associadas ao autismo, como a seguir: diagnóstico de Síndrome de X frágil, Síndrome de Rett, Síndrome de Angelman, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Smith-Lemli-Opitz e Esclerose Tuberosa;
- b) Presença de cáries dentárias ou doença periodontal;
- c) Presença de doença de vias aérea alta ou orofaringe que possam prejudicar a coleta.

- d) Qualquer condição que, no parecer do investigador, colocaria a segurança do sujeito em risco.

7.3 VARIÁVEIS EM ESTUDO

Nesse estudo serão avaliadas as seguintes variáveis:

- a) Expressão relativa de miRNA na saliva;
- b) pontuação das subescalas da *Aberrant Behavior Checklist* (ABC): I - irritabilidade, agitação e choro; II - letargia e esquiva social; III - comportamento estereotipado; IV - hiperatividade; V - fala inapropriada;

7.4 DESFECHO ESPERADO

Espera-se a expressão na saliva dos microRNA seja diferente entre casos e controles.

7.5 LOCAL DE REALIZAÇÃO

As escalas e as coletas de saliva foram realizadas no Ambulatório de TEA e de Pediatria do HCPA. A análise de expressão dos microRNA foi realizada no Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica – UFRGS.

7.6 LOGÍSTICA

As crianças e familiares foram convidados para participar da pesquisa nos Ambulatórios de TEA e Pediatria do HCPA. Após os responsáveis assinarem o TCLE, a criança era convidada a enxaguar a boca com água, e posteriormente a coleta de saliva, cerca de 3 ml por expectoração, era realizada com cuidados para evitar contaminação – uso de luvas, máscara e frasco esterilizado. Imediatamente após a coleta da saliva, essa era transferida para um tubo de microcentrífuga e colocada em gelo. Posteriormente a amostra era transferida para o laboratório de Plasticidade Neuroglial para análise

conforme o item 7.6.1 Para os casos houve aplicação da escala ABC imediatamente após a coleta da saliva, para os controles o pesquisador realizou uma avaliação dos prontuários médicos, uma breve anamnese com os responsáveis e com a criança visando descartar patologias relacionadas ao desenvolvimento.

7.6.1 Coleta de saliva e análise de microRNA

As coletas ocorreram pela manhã, entre as 8 e 12 horas. A criança era convidada a enxaguar a boca com água, e posteriormente a coleta de saliva, cerca de 3ml, era realizada através de expectoração diretamente em frasco esterilizado. Para evitar contaminação, o responsável pela coleta fazia uso de luvas e máscara. Imediatamente a saliva era transferida para tubo de microcentrifuga e colocada em gelo, posteriormente sendo transferida para o laboratório de Plasticidade Neuroglial.

O protocolo para isolamento do exossoma salivar foi adaptado de Machida e colaboradores (MACHIDA *et al.*, 2015). Imediatamente após a coleta, a saliva foi colocada em gelo e em no máximo 2h centrifugada a 2000 g (rcf) durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, transferido para um tubo de centrífuga estéril, imediatamente acondicionado em reagente QIAzol® (diluição 1:2) e estocado em freezer a -80°C para posterior extração de RNA total.

Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa (RT-qPCR)

O RNA total das amostras de saliva foi isolado usando QIAzol® (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada de acordo com (CHEN *et al.*, 2005). Foi adicionado 1.25 mM de 20 *primers stem-loop* (U6, RNU6, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-199-5p, hsa-miR-218-5p) ao mix contendo RNA, oligo(dT)25V (5 mM), 250 mM de dNTPs (Ludwig, RS, Porto Alegre, Brasil) e água livre de RNase para um volume total de 17 ml seguido de uma incubação a 65°C por 5 minutos e resfriamento

em gelo. A enzima MML-V RT (New England Biolabs, MA, USA) foi usada para a síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante. Cada mix de reação foi incubado a 16°C por 30 minutos seguido de outros 30 minutos a 42°C. Todas as amostras de cDNA foram diluídas 50 vezes em água livre de RNase. Os *primers stem-loop*, *primers* de iniciação e o *primer* universal reverso foram desenhados de acordo com (CHEN *et al.*, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real foi realizada no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX384 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O PCR foi realizado no volume de 10 µL contendo 5 µL de cDNA diluído (1:50), 1× SYBR Green I (Invitrogen, CA, USA), 0.1mM de dNTPs, 1× Tampão de PCR, 3mM MgCl₂, 0.25U de Taq DNA Polimerase (Quatro G, RS, Porto Alegre, Brazil) e 200 nM de cada *primer* de iniciação e reverso. Amostras foram analisadas em triplicatas biológicas em placa de 384 poços, e, um controle foi incluído. Os genes de referência foram escolhidos de acordo com o software GeNorm para determinar o número de miRNA necessários para normalização e para identificar os miRNA mais estáveis para serem usados como normalizadores as proteínas ribossomais HsRPS18 Fw (sequência de *primer*: TTC GGA ACT GAG GCC ATG AT) e HsRPS18 Rv (sequência de *primer*: TTT CGC TCT GGT CCG TCT TG) As condições de PCR foram setadas como segue: uma etapa inicial de ativação da polimerase por 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 10 segundos a 60 °C para anelamento e 10 segundos a 72 °C para alongamento. A análise da curva de *melting* foi programada ao fim da corrida de PCR no intervalo de 65 a 95 °C, e a temperatura aumentou gradualmente em 0.4 °C. O limite e as linhas de base foram determinados manualmente usando o software do gerenciador Bio-Rad CFX. Para calcular a expressão relativa dos miRNA foi utilizado o método 2^{-ΔΔCt} (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O teste t de *Student* foi realizado para comparar as diferenças de expressão entre as diferentes amostras. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando p <0,05.

7.7 ASPECTOS ESTATÍSTICOS

7.7.1 Cálculo do tamanho da amostra

O estudo incluiu vinte e seis crianças diagnosticadas com TEA e vinte e seis crianças com desenvolvimento normal, totalizando cinquenta e dois indivíduos. O cálculo do tamanho da amostra (significância 5%, poder 80%) foi realizado no Núcleo de Assistência em Estatística (NAE) do Instituto de Matemática e Estatística da UFRGS, através do programa *nQuery Advisor* [MTTO-2]. Este número de amostras foi efetivo em demonstrar alterações estatisticamente significativas no perfil de miRNA em pacientes com TEA em trabalho prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa (estudo não publicado).

7.7.2 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 21.0, 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 valores de expressão dos miRNA, foi utilizado o teste t de *Student* para amostras independentes. Para significância estatística, foi considerado um valor de p igual ou menor a 0,05.

7.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (registro no Grupo de Pesquisas do HCPA – 16-0567). Os pais e/ou responsáveis assinaram o TCLE (Apêndices B e C).

O protocolo seguiu todos os aspectos éticos e metodológicos da Resolução 466/2012 - Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. A dignidade e o bem-estar dos pacientes incluídos no estudo prevalecerão sobre qualquer outro interesse, sejam econômicos, da ciência ou da comunidade.

8 REFERÊNCIAS

- ABU-ELNEEL, K. *et al.* Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. **Neurogenetics**, v. 9, n. 3, p. 153–161, jul. 2008.
- AHMAD, S. F. *et al.* Imbalance between the anti- and pro-inflammatory milieu in blood leukocytes of autistic children. **Molecular Immunology**, v. 82, p. 57–65, 2017.
- AHMAD, S. F. *et al.* Resveratrol Improves Neuroimmune Dysregulation Through the Inhibition of Neuronal Toll-Like Receptors and COX-2 Signaling in BTBR T+ Itpr3tf/J Mice. **NeuroMolecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 133–146, 21 mar. 2018a.
- AHMAD, S. F. *et al.* Resveratrol attenuates pro-inflammatory cytokines and activation of JAK1-STAT3 in BTBR T + Itpr3 tf /J autistic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 829, p. 70–78, 15 jun. 2018b.
- AL-AYADHI, L. Y. Pro-inflammatory cytokines in autistic children in central Saudi Arabia. **Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)**, v. 10, n. 2, p. 155–158, 2005.
- AL-AYADHI, L. Y.; MOSTAFA, G. A. Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 158, 2012.
- AL-AYADHI, L. Y.; MOSTAFA, G. A. Elevated serum levels of macrophage-derived chemokine and thymus and activation-regulated chemokine in autistic children. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 846, 2013.
- AL-QABANDI, M.; GORTER, J. W.; ROSENBAUM, P. Early autism detection: are we ready for routine screening? **PEDIATRICS**, v. 128, n. 1, p. e211-7, 1 jul. 2011.
- ALMEIDA, L. *et al.* Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53 Suppl 1, p. S7-15, maio 2009.
- AMAN, M. G. *et al.* The aberrant behavior checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. **American Journal of Mental Deficiency**, v. 89, n. 5, p. 485–491, mar. 1985.
- AMARAL, D. G.; SCHUMANN, C. M.; NORDAHL, C. W. Neuroanatomy of autism. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 3, p. 137–145, mar. 2008.
- ANAGNOSTOU, E. *et al.* Autism spectrum disorder: advances in evidence-based practice. **CMAJ: Canadian Medical Association Journal**, v. 186, n. 7, p. 509–519, abr. 2014.
- ANDERSON, G. M. Autism Biomarkers: Challenges, Pitfalls and Possibilities. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, n. 4, p. 1103–1113, 6 abr. 2015.
- ASHWOOD, P. *et al.* Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 204, n. 1–2, p. 149–153, 2008.
- ASHWOOD, P. *et al.* Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, n. 1–2, p. 196–199, 2011a.
- ASHWOOD, P. *et al.* Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. **Brain, behavior, and immunity**, v. 25, n. 1, p. 40–5, jan. 2011b.
- ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition**

(DSM-5®). [s.l.] American Psychiatric Pub, 2013.

ATES, O. *et al.* Effects of resveratrol and methylprednisolone on biochemical, neurobehavioral and histopathological recovery after experimental spinal cord injury. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 10, p. 1317–1325, out. 2006.

ATES, O. *et al.* Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia**, v. 14, n. 3, p. 256–260, mar. 2007.

ATLADOTTIR, H. O. *et al.* Association of Family History of Autoimmune Diseases and Autism Spectrum Disorders. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. 687–694, 1 ago. 2009.

ATLADÓTTIR, H. Ó. *et al.* Maternal Infection Requiring Hospitalization During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 40, n. 12, p. 1423–1430, 23 dez. 2010.

BAIO, J. *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 67, n. 6, p. 1–23, 27 abr. 2018.

BAKHEET, S. A. *et al.* Resveratrol Ameliorates Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T Regulatory Cell-Related Transcription Factor Signaling in a BTBR T + tf/J Mouse Model of Autism. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5201–5212, 2017.

BAMBINI-JUNIOR, V. *et al.* Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. **Brain Research**, v. 1408, p. 8–16, ago. 2011.

BAMBINI-JUNIOR, V. *et al.* Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, v. 583, p. 176–181, 2014.

BANASZEWSKA, B. *et al.* Effects of Resveratrol on Polycystic Ovary Syndrome: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 11, p. 4322–4328, nov. 2016.

BAUMAN, M. D. *et al.* Maternal antibodies from mothers of children with autism alter brain growth and social behavior development in the rhesus monkey. **Translational psychiatry**, v. 3, n. 7, p. e278, 9 jul. 2013.

BAUR, J. A. *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337–342, nov. 2006.

BAXTER, A. J. *et al.* The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. **Psychological Medicine**, v. 45, n. 3, p. 601–613, 2015.

BEDADA, S. K.; NEARATI, P. Effect of resveratrol on the pharmacokinetics of carbamazepine in healthy human volunteers. **Phytotherapy research: PTR**, v. 29, n. 5, p. 701–706, maio 2015.

BELZEAUX, R.; LIN, R.; TURECKI, G. Potential Use of MicroRNA for Monitoring Therapeutic Response to Antidepressants. **CNS Drugs**, v. 31, n. 4, p. 253–262, 13 abr. 2017.

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

BHANDARI, R.; KUHAD, A. Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. **Neurochemistry International**, v. 103, p. 8–23, 2017.

BINIENDA, Z. K. *et al.* Assessment of 3-nitropropionic acid-evoked peripheral neuropathy in rats: neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine and resveratrol. **Neuroscience Letters**, v. 480, n. 2, p. 117–121, ago. 2010.

- BLANDFORD, S. N.; GALLOWAY, D. A.; MOORE, C. S. The roles of extracellular vesicle microRNAs in the central nervous system. **Glia**, 4 maio 2018.
- BO, S. *et al.* Six months of resveratrol supplementation has no measurable effect in type 2 diabetic patients. A randomized, double blind, placebo-controlled trial. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 896–905, set. 2016.
- BORIS, M. *et al.* Effect of pioglitazone treatment on behavioral symptoms in autistic children. **Journal of Neuroinflammation**, v. 4, n. 1, p. 3, 5 jan. 2007.
- BRAUNSCHWEIG, D. *et al.* Autism: maternally derived antibodies specific for fetal brain proteins. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 2, p. 226–31, 6 mar. 2008.
- BRAUNSCHWEIG, D. *et al.* Behavioral Correlates of Maternal Antibody Status Among Children with Autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 42, n. 7, p. 1435–1445, 2012.
- BREECE, E. *et al.* Myeloid dendritic cells frequencies are increased in children with autism spectrum disorder and associated with amygdala volume and repetitive behaviors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 69–75, jul. 2013.
- BRENTANI, H. *et al.* Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. suppl 1, p. S62–S72, 2013.
- BRYNSKIKH, A. *et al.* Adaptive immunity affects learning behavior in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 6, p. 861–869, ago. 2008.
- BUESCHER, A. V. S. *et al.* Costs of Autism Spectrum Disorders in the United Kingdom and the United States. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 721, 1 ago. 2014.
- CAMMARATA, G. *et al.* A pilot study of circulating microRNAs as potential biomarkers of Fabry disease. **Oncotarget**, v. 9, n. 44, p. 27333–27345, 8 jun. 2018.
- CAMPBELL, D. B. *et al.* A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 45, p. 16834–9, 7 nov. 2006.
- CAPURON, L.; CASTANON, N. Role of Inflammation in the Development of Neuropsychiatric Symptom Domains: Evidence and Mechanisms. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 31, p. 31–44, 2016.
- CARDOSO, A. L. *et al.* miR-155 modulates microglia-mediated immune response by down-regulating SOCS-1 and promoting cytokine and nitric oxide production. **Immunology**, v. 135, n. 1, p. 73–88, jan. 2012.
- CAREAGA, M. *et al.* Immune Endophenotypes in Children With Autism Spectrum Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 5, p. 434–441, 2017.
- CAREAGA, M.; VAN DE WATER, J.; ASHWOOD, P. Immune dysfunction in autism: a pathway to treatment. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 7, n. 3, p. 283–292, 2010.
- CHEN, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e179–e179, 27 nov. 2005.
- CHEN, H. H. *et al.* Immune dysregulation in patients with PTEN hamartoma tumor syndrome: Analysis of FOXP3 regulatory T cells. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 139, n. 2, p. 607–620.e15, fev. 2017.
- CHEN, K.; RAJEWSKY, N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. **Nature Reviews. Genetics**, v. 8, n. 2, p. 93–103, fev. 2007.

- CHENG, Y.-S. L.; REES, T.; WRIGHT, J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. **Clinical and Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 3, 2014.
- CHEZ, M. G. *et al.* Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. **Pediatric neurology**, v. 36, n. 6, p. 361–5, jun. 2007.
- CHEZ, M. G.; GUIDO-ESTRADA, N. Immune therapy in autism: historical experience and future directions with immunomodulatory therapy. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 7, n. 3, p. 293–301, 2010.
- COHEN, D. *et al.* Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their identification. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 35, n. 1, p. 103–16, fev. 2005.
- COURCHESNE, E. *et al.* Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. **Neurology**, v. 57, n. 2, p. 245–54, 24 jul. 2001.
- CROEN, L. A. *et al.* Maternal autoimmune diseases, asthma and allergies, and childhood autism spectrum disorders: a case-control study. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 159, n. 2, p. 151–7, 1 fev. 2005.
- CROONENBERGHS, J. *et al.* Activation of the Inflammatory Response System in Autism. **Neuropsychobiology**, v. 45, n. 1, p. 1–6, 2002.
- CROWELL, J. A. *et al.* Resveratrol-associated renal toxicity. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 614–619, dez. 2004.
- CSISZAR, A. *et al.* Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 54, n. 3, p. 668–675, set. 2009.
- DELLA-MORTE, D. *et al.* Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 993–1002, mar. 2009.
- DENK, J.; JAHN, H. MicroRNA Profiling of Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1750, p. 93–107, mar. 2018.
- DROBITCH, R. K.; SVENSSON, C. K. Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 23, n. 5, p. 365–379, nov. 1992.
- DRUSCO, A. *et al.* Circulating Micrnas Predict Survival of Patients with Tumors of Glial Origin. **EBioMedicine**, v. 30, p. 105–112, abr. 2018.
- EISSA, N. *et al.* Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 304, 16 maio 2018.
- EL-ANSARY, A. *et al.* Identification of Biomarkers of Impaired Sensory Profiles among Autistic Patients. **PloS One**, v. 11, n. 11, p. e0164153, 2016.
- EL GOHARY, T. M. *et al.* Plasma level of transforming growth factor β 1 in children with autism spectrum disorder. **Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences**, v. 16, n. 1, p. 69–73, 2015.
- ELLIOTT, P. J. *et al.* Resveratrol/SRT-501. **Drugs of the Future**, v. 34, n. 4, p. 291, 2009.
- EMANUELE, E. *et al.* Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. **Neuroscience letters**, v. 471, n. 3, p. 162–5, 8 mar. 2010.
- ENSTROM, A. *et al.* Detection of IL-17 and IL-23 in Plasma Samples of Children with Autism. **American Journal of Biochemistry & Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 114–120, 2008.
- ENSTROM, A. *et al.* Increased IgG4 levels in children with autism disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 3, p. 389–395, mar. 2009.

- ENSTROM, A. M. *et al.* Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 1, p. 64–71, jan. 2010.
- ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 469–486, 2015.
- FAGHIHZADEH, F.; ADIBI, P.; HEKMATDOOST, A. The effects of resveratrol supplementation on cardiovascular risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **The British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 5, p. 796–803, set. 2015.
- FARAH, R. *et al.* Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. **Biomedical Journal**, v. 41, n. 2, p. 63–87, abr. 2018.
- FERGUSON, B. J. *et al.* Associations between cytokines, endocrine stress response, and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 58, p. 57–62, 2016.
- FERRI, S. L.; ABEL, T.; BRODKIN, E. S. Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: a Review. **Current Psychiatry Reports**, v. 20, n. 2, p. 9, 5 fev. 2018.
- FONTES-DUTRA, M. *et al.* Resveratrol prevents cellular and behavioral sensory alterations in the animal model of autism induced by valproic acid. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 10, n. MAY, p. 9, 2018.
- FULCERI, F. *et al.* Antenatal ultrasound value in risk calculation for Autism Spectrum Disorder: A systematic review to support future research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 92, p. 83–92, 17 set. 2018.
- GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. [Autism and pervasive developmental disorders]. **Jornal De Pediatria**, v. 80, n. 2 Suppl, p. S83-94, abr. 2004.
- GALLO, A. *et al.* The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. **PloS One**, v. 7, n. 3, p. e30679, 2012.
- GANZ, J. B. *et al.* Meta-analysis of PECS with individuals with ASD: Investigation of targeted versus non-targeted outcomes, participant characteristics, and implementation phase. **Research in Developmental Disabilities**, v. 33, n. 2, p. 406–418, mar. 2012.
- GARDENER, H.; SPIEGELMAN, D.; BUKA, S. L. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. **British Journal of Psychiatry**, v. 195, n. 01, p. 7–14, 2 jul. 2009.
- GARDENER, H.; SPIEGELMAN, D.; BUKA, S. L. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. **Pediatrics**, v. 128, n. 2, p. 344–55, 1 ago. 2011.
- GEAGHAN, M.; CAIRNS, M. J. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 4, p. 231–239, ago. 2015.
- GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 12, n. 10, p. 953–957, out. 2003.
- GHALEIHA, A. *et al.* A pilot double-blind placebo-controlled trial of pioglitazone as adjunctive treatment to risperidone: Effects on aberrant behavior in children with autism. **Psychiatry Research**, v. 229, n. 1–2, p. 181–187, 2015.
- GILLBERG, C. *et al.* Brief report: “the autism epidemic”: The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 36, n. 3, p. 429–35, 28 abr. 2006.

GLADYSZ, D.; KRZYWDZIŃSKA, A.; HOZYASZ, K. K. Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder-Could They Hold Promise for Causative Treatment? **Molecular Neurobiology**, 2018.

GOEL, R. *et al.* An update on pharmacotherapy of autism spectrum disorder in children and adolescents. **International Review of Psychiatry**, v. 30, n. 1, p. 78–95, 2 jan. 2018.

GOINES, P. *et al.* Autoantibodies to cerebellum in children with autism associate with behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 514–523, 2011.

GOINES, P. E.; ASHWOOD, P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. **Neurotoxicology and teratology**, v. 36, p. 67–81, mar. 2013.

GOLDANI, A. A. S. *et al.* Biomarkers in autism. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 100, 12 ago. 2014.

GOTTFRIED, C. *et al.* The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, p. 121, 2015.

GOTTFRIED, T. *et al.* Reliability of the Music in Everyday Life (MEL) Scale: A Parent-Report Assessment for Children on the Autism Spectrum. **Journal of Music Therapy**, v. 55, n. 2, p. 133–155, 7 jun. 2018.

GREYDANUS, D. E.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. Historical Perspectives on Autism: Its Past Record of Discovery and Its Present State of Solipsism, Skepticism, and Sorrowful Suspicion. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 1–11, fev. 2012.

GUO, S. *et al.* microRNA based prognostic biomarkers in pancreatic Cancer. **Biomarker Research**, v. 6, n. 1, p. 18, 21 dez. 2018.

GUY W. **ECDEU assessment manual for psychopharmacology: Guy, William: Free Download, Borrow, and Streaming: Internet Archive.** Disponível em: <<https://archive.org/details/ecdeuassessmentm1933guyw>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

HAECKEL, R.; HÄNECKE, P. The application of saliva, sweat and tear fluid for diagnostic purposes. **Annales De Biologie Clinique**, v. 51, n. 10–11, p. 903–910, 1993.

HAN, Y. M. Y. *et al.* Distinct Cytokine and Chemokine Profiles in Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

HAPPÉ, F.; RONALD, A.; PLOMIN, R. Time to give up on a single explanation for autism. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 1218–20, 1 out. 2006.

HE, F. *et al.* Modulation of *miR-146a* /complement factor H-mediated inflammatory responses in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 6, p. e00433, dez. 2016.

HEEBØLL, S. *et al.* Placebo-controlled, randomised clinical trial: high-dose resveratrol treatment for non-alcoholic fatty liver disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 4, p. 456–464, 2016.

HEUER, L. *et al.* Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 1, n. 5, p. 275–283, 2008.

HEUNIS, T.-M.; ALDRICH, C.; DE VRIES, P. J. Recent Advances in Resting-State Electroencephalography Biomarkers for Autism Spectrum Disorder-A Review of Methodological and Clinical Challenges. **Pediatric Neurology**, v. 61, p. 28–37, ago. 2016.

HICKS, S. D. *et al.* Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. **BMC pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 52, 2016.

- HIRSCH, M. M. *et al.* Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 336–343, maio 2018.
- HOEKSTRA, P. J. *et al.* Risperidone-induced weight gain in referred children with autism spectrum disorders is associated with a common polymorphism in the 5-hydroxytryptamine 2C receptor gene. **Journal of child and adolescent psychopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 473–7, dez. 2010.
- HONG, S.-W. *et al.* The protective effect of resveratrol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 4, p. 601–609, abr. 2010.
- HOSS, A. G. *et al.* MicroRNAs located in the Hox gene clusters are implicated in huntington's disease pathogenesis. **PLoS genetics**, v. 10, n. 2, p. e1004188, fev. 2014.
- HOWLIN, P. *et al.* Adult outcome for children with autism. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 45, n. 2, p. 212–29, fev. 2004.
- HOWLIN, P.; MAWHOOD, L.; RUTTER, M. Autism and developmental receptive language disorder--a follow-up comparison in early adult life. II: Social, behavioural, and psychiatric outcomes. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 41, n. 5, p. 561–78, jul. 2000.
- HU, G.; DRESCHER, K. M.; CHEN, X.-M. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 56, 2012.
- HUANG, F. *et al.* Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129052, 10 jun. 2015.
- HUANG, S. *et al.* Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 32, n. 1, p. 512–528, jan. 2018.
- HUMEAU, M. *et al.* Salivary MicroRNA in Pancreatic Cancer Patients. **PloS One**, v. 10, n. 6, p. e0130996, 2015.
- IMAMURA, H. *et al.* Resveratrol Ameliorates Arterial Stiffness Assessed by Cardio-Ankle Vascular Index in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **International Heart Journal**, v. 58, n. 4, p. 577–583, 3 ago. 2017.
- INANAGA, K. *et al.* Resveratrol attenuates angiotensin II-induced interleukin-6 expression and perivascular fibrosis. **Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 32, n. 6, p. 466–471, jun. 2009.
- INGA JÁCOME, M. C. *et al.* Peripheral Inflammatory Markers Contributing to Comorbidities in Autism. **Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 4, 2016.
- IYER, A. *et al.* MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e44789, 13 set. 2012.
- JAIN, A. *et al.* Autism occurrence by MMR vaccine status among US children with older siblings with and without autism. **JAMA**, v. 313, n. 15, p. 1534–40, 21 abr. 2015.
- JANG, M. *et al.* Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 275, n. 5297, p. 218–220, jan. 1997.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. The Production of Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 42, n. 1, p. 41–46, jan. 1991.

- JIANG, H. *et al.* Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 58, p. 165–172, nov. 2016.
- JICKLING, G. C. *et al.* Leukocyte response is regulated by microRNA let7i in patients with acute ischemic stroke. **Neurology**, v. 87, n. 21, p. 2198–2205, 22 nov. 2016.
- JOHNSON, C. P.; MYERS, S. M.; AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS COUNCIL ON CHILDREN WITH DISABILITIES. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v. 120, n. 5, p. 1183–215, 1 nov. 2007.
- JUAN, M. E.; VINARDELL, M. P.; PLANAS, J. M. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 2, p. 257–260, fev. 2002.
- JUSKO, W. J.; MILSAP, R. L. Pharmacokinetic principles of drug distribution in saliva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 694, p. 36–47, set. 1993.
- JYONOUCHI, H. *et al.* Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. **Neuropsychobiology**, v. 51, n. 2, p. 77–85, 2005.
- JYONOUCHI, H. *et al.* MicroRNA expression changes in association with changes in interleukin-1 β /interleukin10 ratios produced by monocytes in autism spectrum disorders: their association with neuropsychiatric symptoms and comorbid conditions (observational study). **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 229, 25 nov. 2017.
- JYONOUCHI, H.; GENG, L.; DAVIDOW, A. L. Cytokine profiles by peripheral blood monocytes are associated with changes in behavioral symptoms following immune insults in a subset of ASD subjects: an inflammatory subtype? **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 187, 2014.
- JYONOUCHI, H.; SUN, S.; LE, H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. **Journal of neuroimmunology**, v. 120, n. 1–2, p. 170–9, 1 nov. 2001.
- KAI, K.; DITTMAR, R. L.; SEN, S. Secretory microRNAs as biomarkers of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 78, p. 22–36, jun. 2018.
- KAMAL, M. A.; MUSHTAQ, G.; GREIG, N. H. Current Update on Synopsis of miRNA Dysregulation in Neurological Disorders. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 14, n. 4, p. 492–501, 2015.
- KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Acta paedopsychiatrica**, v. 35, n. 4, p. 100–36, 1968.
- KAPLAN, G.; MCCracken, J. T. Psychopharmacology of Autism Spectrum Disorders. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 175–187, fev. 2012.
- KARST, J. S.; VAN HECKE, A. V. Parent and family impact of autism spectrum disorders: a review and proposed model for intervention evaluation. **Clinical Child and Family Psychology Review**, v. 15, n. 3, p. 247–277, 2012.
- KARUPPAGOUNDER, S. S. *et al.* Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 54, n. 2, p. 111–118, fev. 2009.
- KENNEDY, D. O. *et al.* Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. **The**

American Journal of Clinical Nutrition, v. 91, n. 6, p. 1590–1597, jun. 2010.

KHAN, M. M. *et al.* Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1328, p. 139–151, abr. 2010.

KHO, A. T. *et al.* Circulating microRNAs and prediction of asthma exacerbation in childhood asthma. **Respiratory Research**, v. 19, n. 1, p. 128, 26 dez. 2018.

KICHUKOVA, T. M. *et al.* Profiling of Circulating Serum MicroRNAs in Children with Autism Spectrum Disorder using Stem-loop qRT-PCR Assay. **Folia medica**, v. 59, n. 1, p. 43–52, 1 mar. 2017.

KIM, D. *et al.* SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. **The EMBO journal**, v. 26, n. 13, p. 3169–3179, jul. 2007.

KIM, J.; WIGRAM, T.; GOLD, C. The effects of improvisational music therapy on joint attention behaviors in autistic children: a randomized controlled study. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 38, n. 9, p. 1758–66, 1 out. 2008.

KIM, Y.-H. *et al.* Resveratrol inhibits neuronal apoptosis and elevated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in diabetic mouse retina. **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1825–1835, jul. 2010.

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

KIZILTEPE, U. *et al.* Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. **Journal of Vascular Surgery**, v. 40, n. 1, p. 138–145, jul. 2004.

KJÆR, T. N. *et al.* No Beneficial Effects of Resveratrol on the Metabolic Syndrome: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 5, p. 1642–1651, 1 maio 2017.

KLIN, A. [Autism and Asperger syndrome: an overview]. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 28 Suppl 1, p. S3-11, maio 2006.

KOLVIN, I. Infantile autism or infantile psychoses. **British medical journal**, v. 3, n. 5829, p. 753–5, 23 set. 1972.

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

KOPKOVA, A. *et al.* Cerebrospinal fluid microRNAs as diagnostic biomarkers in brain tumors. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 56, n. 6, p. 869–879, 24 maio 2018.

KUMAR, A.; SHARMA, S. S. NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 2, p. 360–365, abr. 2010.

KUMAR, P. *et al.* Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. **Behavioural Pharmacology**, v. 17, n. 5–6, p. 485–492, set. 2006.

LA PORTE, C. *et al.* Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 7, p. 449–454, jul. 2010.

LACIVITA, E. *et al.* Targets for Drug Therapy for Autism Spectrum Disorder: Challenges and Future Directions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 9114–9141, 2017.

- LEE, L.-C. *et al.* Variation in season of birth in singleton and multiple births concordant for autism spectrum disorders. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 22, n. 2, p. 172–9, mar. 2008.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, dez. 1993.
- LEVY, S. E.; MANDELL, D. S.; SCHULTZ, R. T. Autism. **Lancet (London, England)**, v. 374, n. 9701, p. 1627–38, 7 nov. 2009.
- LI, D.; KARNATH, H.-O.; XU, X. Candidate Biomarkers in Children with Autism Spectrum Disorder: A Review of MRI Studies. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 219–237, 2017.
- LI, T.-R. *et al.* The role of the microRNA-146a/complement factor H/interleukin-1 β -mediated inflammatory loop circuit in the perpetuate inflammation of chronic temporal lobe epilepsy. **Disease models & mechanisms**, v. 11, n. 3, 2018.
- LI, X.-Q. *et al.* MiR-27a ameliorates inflammatory damage to the blood-spinal cord barrier after spinal cord ischemia: reperfusion injury in rats by downregulating TICAM-2 of the TLR4 signaling pathway. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 25, 7 fev. 2015.
- LI, X. *et al.* Elevated immune response in the brain of autistic patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 207, n. 1–2, p. 111–116, fev. 2009.
- LIN, C.-T.; SUN, X.-Y.; LIN, A.-X. Supplementation with high-dose trans-resveratrol improves ultrafiltration in peritoneal dialysis patients: a prospective, randomized, double-blind study. **Renal Failure**, v. 38, n. 2, p. 214–221, 2016.
- LIU, D. Z. *et al.* Elevating microRNA-122 in blood improves outcomes after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 36, n. 8, p. 1374–83, 19 ago. 2016.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.
- LOSAPPIO, M. F. *et al.* Partial cross-cultural adaptation of the Aberrant Behavior Checklist (ABC) scale for analysis of patients with mental retardation. **Cadernos De Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 909–923, maio 2011.
- LOUVEAU, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 337–341, 1 jul. 2015.
- LOUW, A. M. *et al.* Chitosan polyplex mediated delivery of miRNA-124 reduces activation of microglial cells in vitro and in rat models of spinal cord injury. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 12, n. 3, p. 643–653, abr. 2016.
- LU, K.-T. *et al.* Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 6910–6913, ago. 2008.
- LUKIW, W. J. *et al.* Upregulation of Micro RNA-146a (miRNA-146a), A Marker for Inflammatory Neurodegeneration, in Sporadic Creutzfeldt–Jakob Disease (sCJD) and Gerstmann–Straussler–Scheinker (GSS) Syndrome. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 74, n. 22–24, p. 1460–1468, 15 nov. 2011.
- MACEDO, R. C. S. *et al.* Effects of chronic resveratrol supplementation in military firefighters undergo a physical fitness test—a placebo-controlled, double blind study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 89–95, fev. 2015.

- MACHIDA, T. *et al.* MicroRNAs in Salivary Exosome as Potential Biomarkers of Aging. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 21294–309, 7 set. 2015.
- MACK, G. S. MicroRNA gets down to business. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 631–8, 1 jun. 2007.
- MAGLIONE, M. A. *et al.* Nonmedical interventions for children with ASD: recommended guidelines and further research needs. **Pediatrics**, v. 130 Suppl 2, n. Supplement 2, p. S169-78, 1 nov. 2012.
- MAKINODAN, M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with early childhood social interaction in autism spectrum disorder. **Neurochemistry International**, v. 104, p. 1–5, 2017.
- MALIK, M. *et al.* Expression of inflammatory cytokines, Bcl2 and cathepsin D are altered in lymphoblasts of autistic subjects. **Immunobiology**, v. 216, n. 1–2, p. 80–5, jan. 2011.
- MANNA, I. *et al.* Exosome-associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients. **The FASEB Journal**, p. fj.201701533R, 5 mar. 2018.
- MARCHEZAN, J. *et al.* A Placebo-Controlled Crossover Trial of Gastrin-Releasing Peptide in Childhood Autism. **Clinical Neuropharmacology**, v. 40, n. 3, p. 108–112, 2017.
- MARTÍN, A. R. *et al.* The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 8, p. 873–885, abr. 2006.
- MASI, A. *et al.* Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 440–446, 2015.
- MASI, A. *et al.* The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 194–204, 2017.
- MCBRIDE, K. L. *et al.* Confirmation study of PTEN mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly. **Autism research: official journal of the International Society for Autism Research**, v. 3, n. 3, p. 137–41, 18 jun. 2010.
- MCDOUGLE, C. J. *et al.* Toward an immune-mediated subtype of autism spectrum disorder. **Brain Research**, v. 1617, p. 72–92, 2015.
- MEAD, J.; ASHWOOD, P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 49–55, 2015.
- MEFFORD, H. C.; BATSHAW, M. L.; HOFFMAN, E. P. Genomics, intellectual disability, and autism. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 8, p. 733–43, 23 fev. 2012.
- MELLIOS, N.; SUR, M. The Emerging Role of microRNAs in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 3, p. 39, 2012.
- MELTZER, A.; VAN DE WATER, J. The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 284–298, 2017.
- MI, S. *et al.* MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 50, p. 19971–19976, dez. 2007.
- MILES, J. H. Autism spectrum disorders - A genetics review. **Genetics in Medicine**, v. 13, n. 4, p. 278–294, 24 abr. 2011.
- MINSHEW, N. J.; WILLIAMS, D. L. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and

neuronal organization. **Archives of neurology**, v. 64, n. 7, p. 945–50, 1 jul. 2007.

MITCHELL, R. H. B.; GOLDSTEIN, B. I. Inflammation in Children and Adolescents With Neuropsychiatric Disorders: A Systematic Review. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 53, n. 3, p. 274–296, mar. 2014.

MOKNI, M. *et al.* Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 6, p. 981–987, jun. 2007.

MOR, M. *et al.* Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. **Molecular Autism**, v. 6, p. 46, 2015.

MORGAN, J. T. *et al.* Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. **Biological psychiatry**, v. 68, n. 4, p. 368–76, 15 ago. 2010.

MOSTAFA, G. A.; AL-AYADHI, L. Y. The relationship between the increased frequency of serum antineuronal antibodies and the severity of autism in children. **European journal of paediatric neurology: EJPN**, v. 16, n. 5, p. 464–468, 2012.

MOSTAFA, G. A.; EL-SHERIF, D. F.; AL-AYADHI, L. Y. Systemic auto-antibodies in children with autism. **Journal of Neuroimmunology**, v. 272, n. 1–2, p. 94–98, 15 jul. 2014.

MOVAHED, A. *et al.* The efficacy of resveratrol in controlling hypertension: study protocol for a randomized, crossover, double-blinded, placebo-controlled trial. **Trials**, v. 17, n. 1, p. 296, 23 dez. 2016.

MUHLE, R.; TRENTACOSTE, S. V.; RAPIN, I. The genetics of autism. **Pediatrics**, v. 113, n. 5, p. e472–86, maio 2004.

MUNDALIL VASU, M. *et al.* Serum microRNA profiles in children with autism. **Molecular Autism**, v. 5, p. 40, 2014.

NAPOLIONI, V. *et al.* Plasma cytokine profiling in sibling pairs discordant for autism spectrum disorder. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 38, 2013.

NAZEER, A.; GHAZIUDDIN, M. Autism Spectrum Disorders: Clinical Features and Diagnosis. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 19–25, fev. 2012.

NEJAD, C.; STUNDEN, H. J.; GANTIER, M. P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. **The FEBS Journal**, 6 maio 2018.

NI, J. *et al.* MicroRNA let-7c-5p protects against cerebral ischemia injury via mechanisms involving the inhibition of microglia activation. **Brain, behavior, and immunity**, v. 49, p. 75–85, out. 2015.

NORIEGA, D. B.; SAVELKOUL, H. F. J. Immune dysregulation in autism spectrum disorder. **European Journal of Pediatrics**, v. 173, n. 1, p. 33–43, 2014.

NUNES, T. *et al.* Pharmacokinetics of trans-resveratrol following repeated administration in healthy elderly and young subjects. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, n. 12, p. 1477–1482, dez. 2009.

OHJA, K. *et al.* Neuroimmunologic and Neurotrophic Interactions in Autism Spectrum Disorders: Relationship to Neuroinflammation. **NeuroMolecular Medicine**, v. 20, n. 2, p. 161–173, 24 jun. 2018.

OKADA, K. *et al.* Decreased serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with autism. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 31, n. 1, p. 187–90, 30 jan. 2007.

- OLIVIÉ, H. The medical care of children with autism. **European journal of pediatrics**, v. 171, n. 5, p. 741–9, 18 maio 2012.
- OMRAN, A. *et al.* Interleukin-1 β and microRNA-146a in an immature rat model and children with mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, n. 7, p. 1215–24, jul. 2012.
- ONORE, C.; CAREAGA, M.; ASHWOOD, P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 3, p. 383–392, mar. 2012.
- OOMEN, C. A. *et al.* Resveratrol preserves cerebrovascular density and cognitive function in aging mice. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 1, p. 4, 2009.
- PARELLADA, M. *et al.* The neurobiology of autism spectrum disorders. **European Psychiatry**, v. 29, n. 1, p. 11–19, jan. 2014.
- PATEL, K. R. *et al.* Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer Research**, v. 70, n. 19, p. 7392–7399, out. 2010.
- PIRAS, I. S. *et al.* Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 38, p. 91–99, 2014.
- POLLEY, K. R. *et al.* Influence of exercise training with resveratrol supplementation on skeletal muscle mitochondrial capacity. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 41, n. 1, p. 26–32, jan. 2016.
- PUTTEERAJ, M.; FAIRUZ, Y. M.; TEOH, S. L. MicroRNA Dysregulation in Alzheimer's Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 9, p. 1000–1009, 19 jan. 2018.
- QIU, L.; TAN, E. K.; ZENG, L. microRNAs and Neurodegenerative Diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 888, p. 85–105, 2015.
- QUINCOZES-SANTOS, A.; GOTTFRIED, C. Resveratrol modulates astroglial functions: Neuroprotective hypothesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 1, p. 72–78, 2011.
- RANNEY, A.; PETRO, M. S. Resveratrol protects spatial learning in middle-aged C57BL/6 mice from effects of ethanol. **Behavioural Pharmacology**, v. 20, n. 4, p. 330–336, jul. 2009.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 3, p. 659–661, mar. 2008.
- REGEV, K. *et al.* Comprehensive evaluation of serum microRNAs as biomarkers in multiple sclerosis. **Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation**, v. 3, n. 5, p. e267, 23 out. 2016.
- RICCI, S. *et al.* Altered Cytokine and BDNF Levels in Autism Spectrum Disorder. **Neurotoxicity Research**, v. 24, n. 4, p. 491–501, 2013.
- RIVERA, L. *et al.* Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 1053–1063, mar. 2009.
- ROBB, E. L. *et al.* Dietary resveratrol administration increases MnSOD expression and activity in mouse brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, n. 1, p. 254–259, jul. 2008.
- ROSE, D.; VAN DE WATER, J.; ASHWOOD, P. Unique immune profiles in children with autism who experience gastrointestinal co-morbidity. **Brain, Behavior, and Immunity, PsychoNeuroImmunology Research Society's 23rd Annual Scientific Meeting**. v. 57, p. e23–e24,

2016.

ROSSIGNOL, D. A. Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: A systematic review. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 213-36, 2009.

RUGGERI, B. *et al.* Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 6, p. 1201–1216, 2014.

RUTTER, M. Childhood schizophrenia reconsidered. **Journal of autism and childhood schizophrenia**, v. 2, n. 4, p. 315–37, 1972.

SAKATA, Y. *et al.* Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. **Experimental Neurology**, v. 224, n. 1, p. 325–329, jul. 2010.

SALAZAR, C. *et al.* A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. **Cellular Oncology (Dordrecht)**, v. 37, n. 5, p. 331–338, out. 2014.

SALDANHA, J. F. *et al.* Effects of Resveratrol Supplementation in Nrf2 and NF-κB Expressions in Nondialyzed Chronic Kidney Disease Patients: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Clinical Trial. **Journal of Renal Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 401–406, nov. 2016.

SAMSAMIKOR, M. *et al.* Resveratrol Supplementation and Oxidative/Anti-Oxidative Status in Patients with Ulcerative Colitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Pilot Study. **Archives of Medical Research**, v. 47, n. 4, p. 304–309, maio 2016.

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

SARACHANA, T. *et al.* Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. **Genome Medicine**, v. 2, n. 4, p. 23, 2010.

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

SCHAEFER, G. B.; MENDELSON, N. J.; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 15, n. 5, p. 399–407, 21 maio 2013.

SCHWARTZ, M. *et al.* How do immune cells support and shape the brain in health, disease, and aging? **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 45, p. 17587–96, 6 nov. 2013.

SENER, G. *et al.* Resveratrol alleviates bleomycin-induced lung injury in rats. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, n. 6, p. 642–649, 2007.

SENGOTTUVELAN, M.; DEEPTHA, K.; NALINI, N. Influence of dietary resveratrol on early and late molecular markers of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 25, n. 11–12, p. 1169–1176, dez. 2009.

SEYYEDEBRAHIMI, S. *et al.* The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Acta Diabetologica**, v. 55, n. 4, p. 341–353, 22 abr. 2018.

SHARMA, S. R.; GONDA, X.; TARAZI, F. I. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, 12 maio 2018.

SHI, G. *et al.* Resveratrol improves treatment outcome and laboratory parameters in patients with

- Takayasu arteritis: A randomized double-blind and placebo-controlled trial. **Immunobiology**, v. 222, n. 2, p. 164–168, fev. 2017.
- SIASOS, G.; TSIGKOU, V.; TOUSOULIS, D. Circulating microRNAs as novel biomarkers in heart failure. **Hellenic Journal of Cardiology**, 23 jun. 2018.
- SIMONOFF, E. Autism spectrum disorder: prevalence and cause may be bound together. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 201, n. 02, p. 88–9, 2 ago. 2012.
- SINGER, H. S. *et al.* Antibodies against fetal brain in sera of mothers with autistic children. **Journal of neuroimmunology**, v. 194, n. 1–2, p. 165–72, fev. 2008.
- SINGLETON, R. H. *et al.* Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 27, n. 6, p. 1091–1099, jun. 2010.
- SINHA, K.; CHAUDHARY, G.; GUPTA, Y. K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Life Sciences**, v. 71, n. 6, p. 655–665, jun. 2002.
- SMITH, L. E.; GREENBERG, J. S.; MAILICK, M. R. The family context of autism spectrum disorders: influence on the behavioral phenotype and quality of life. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 143–155, 2014.
- SÖNMEZ, U. *et al.* Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats. **Neuroscience Letters**, v. 420, n. 2, p. 133–137, jun. 2007.
- STANKOVIC, M.; LAKIC, A.; ILIC, N. Autism and autistic spectrum disorders in the context of new DSM-V classification, and clinical and epidemiological data. **Srpski arhiv za celokupno lekarstvo**, v. 140, n. 3–4, p. 236–243, 2012.
- STOICEA, N. *et al.* The MiRNA Journey from Theory to Practice as a CNS Biomarker. **Frontiers in Genetics**, v. 7, p. 11, 9 fev. 2016.
- STREIT, W. J. Microglia and macrophages in the developing CNS. **Neurotoxicology**, v. 22, n. 5, p. 619–24, out. 2001.
- STUBBS, E. G. Autistic children exhibit undetectable hemagglutination-inhibition antibody titers despite previous rubella vaccination. **Journal of Autism and Childhood Schizophrenia**, v. 6, n. 3, p. 269–274, 1976.
- STUBBS, E. G.; CRAWFORD, M. L. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. **Journal of autism and childhood schizophrenia**, v. 7, n. 1, p. 49–55, mar. 1977.
- SUN, P. *et al.* MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, p. 271678X18773871, 1 jan. 2018.
- SUN, X.; SIT, A.; FEINBERG, M. W. Role of miR-181 family in regulating vascular inflammation and immunity. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 24, n. 3, p. 105–12, abr. 2014.
- SUZUKI, K. *et al.* Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e20470, 27 maio 2011.
- SUZUKI, K. *et al.* Microglial Activation in Young Adults With Autism Spectrum Disorder. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 1, p. 49, 1 jan. 2013.
- TALEBIZADEH, Z.; BUTLER, M. G.; THEODORO, M. F. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. **Autism Research:**

Official Journal of the International Society for Autism Research, v. 1, n. 4, p. 240–250, ago. 2008.

TAN, K. S. *et al.* Expression Profile of MicroRNAs in Young Stroke Patients. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e7689, 2 nov. 2009.

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

THAZHATH, S. S. *et al.* Administration of resveratrol for 5 wk has no effect on glucagon-like peptide 1 secretion, gastric emptying, or glycemic control in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 103, n. 1, p. 66–70, jan. 2016.

THEIS, T. *et al.* Lentiviral Delivery of miR-133b Improves Functional Recovery After Spinal Cord Injury in Mice. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 6, p. 4659–4671, 13 ago. 2017.

THEOHARIDES, T. C. *et al.* Mast cells, brain inflammation and autism. **European Journal of Pharmacology**, v. 778, p. 96–102, 5 maio 2016.

TIAN, L. *et al.* Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. **Journal of neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 155, 2 jul. 2012.

TIMMERS, S. *et al.* Resveratrol as Add-on Therapy in Subjects With Well-Controlled Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. **Diabetes Care**, v. 39, n. 12, p. 2211–2217, dez. 2016.

TSAI, S.-K. *et al.* Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. **Journal of Vascular Surgery**, v. 46, n. 2, p. 346–353, ago. 2007.

TSUJITA, Y. *et al.* Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase δ syndrome-like immunodeficiency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 6, p. 1672–1680.e10, dez. 2016.

TUNALI-AKBAY, T. *et al.* Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques**, v. 13, n. 2, p. 303–310, 2010.

TURNER, R. S. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. **Neurology**, v. 85, n. 16, p. 1383–1391, out. 2015.

VAN DER MADE, S. M.; PLAT, J.; MENSINK, R. P. Resveratrol does not influence metabolic risk markers related to cardiovascular health in overweight and slightly obese subjects: a randomized, placebo-controlled crossover trial. **PLoS one**, v. 10, n. 3, p. e0118393, 19 mar. 2015.

VANG, O. *et al.* What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, jun. 2011.

VARGAS, D. L. *et al.* Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 1, p. 67–81, jan. 2005.

VERHOEFF, B. Autism in flux: a history of the concept from Leo Kanner to DSM-5. **History of psychiatry**, v. 24, n. 4, p. 442–58, 18 dez. 2013.

VERKHRATSKY, A.; RODRÍGUEZ, J. J.; PARPURA, V. Neuroglia in ageing and disease. **Cell and Tissue Research**, v. 357, n. 2, p. 493–503, 2014.

VITKOVIC, L. *et al.* Cytokine signals propagate through the brain. **Molecular psychiatry**, v. 5, n. 6, p. 604–15, nov. 2000.

VODUC, N. *et al.* Effect of resveratrol on exercise capacity: a randomized placebo-controlled crossover pilot study. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie**

- Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 39, n. 10, p. 1183–1187, out. 2014.
- VOLKMAR, F. R.; MCPARTLAND, J. C. From Kanner to DSM-5: autism as an evolving diagnostic concept. **Annual review of clinical psychology**, v. 10, n. 1, p. 193–212, 28 mar. 2014.
- WALLE, T. *et al.* High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 32, n. 12, p. 1377–1382, dez. 2004.
- WANG, Y. *et al.* Identification of miRNAs as potential new biomarkers for nervous system cancer. **Tumor Biology**, v. 35, n. 11, p. 11631–11638, 20 nov. 2014.
- WARREN, Z. *et al.* A Systematic Review of Early Intensive Intervention for Autism Spectrum Disorders. **PEDIATRICS**, v. 127, n. 5, p. e1303–e1311, 1 maio 2011.
- WEI, H. *et al.* IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 52, 19 maio 2011.
- WEISS, J. A. *et al.* The impact of child problem behaviors of children with ASD on parent mental health: the mediating role of acceptance and empowerment. **Autism: The International Journal of Research and Practice**, v. 16, n. 3, p. 261–274, 2012.
- WILLIAMS, L. D. *et al.* Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 47, n. 9, p. 2170–2182, set. 2009.
- WONG, R. H. X. *et al.* Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 21, n. 11, p. 851–856, nov. 2011.
- WONG, R. H. X. *et al.* Chronic resveratrol consumption improves brachial flow-mediated dilatation in healthy obese adults. **Journal of Hypertension**, v. 31, n. 9, p. 1819–1827, set. 2013.
- WONG, R. H. X.; EVANS, H. M.; HOWE, P. R. C. Resveratrol supplementation reduces pain experience by postmenopausal women. **Menopause**, v. 24, n. 8, p. 916–922, ago. 2017.
- WU, S. *et al.* Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 322–332, ago. 2015.
- WU, Z. *et al.* Protective effect of resveratrol against kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 8, p. 1393–1400, ago. 2009.
- XIAOYAN, W. *et al.* MicroRNA-155: a Novel Armamentarium Against Inflammatory Diseases. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 708–716, 15 abr. 2017.
- XIE, Z. *et al.* Salivary microRNAs show potential as a noninvasive biomarker for detecting resectable pancreatic cancer. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 8, n. 2, p. 165–173, fev. 2015.
- XU, G. *et al.* Maternal Diabetes and the Risk of Autism Spectrum Disorders in the Offspring: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 44, n. 4, p. 766–775, 22 abr. 2014.
- XU, N.; LI, X.; ZHONG, Y. Inflammatory Cytokines: Potential Biomarkers of Immunologic Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–10, 2015.
- YANG, C.-J. *et al.* The combined role of serotonin and interleukin-6 as biomarker for autism. **Neuroscience**, v. 284, p. 290–296, 2015.

- YANG, X. *et al.* MicroRNA-15a/16-1 Antagomir Ameliorates Ischemic Brain Injury in Experimental Stroke. **Stroke**, v. 48, n. 7, p. 1941–1947, jul. 2017.
- YANG, Y.-B.; PIAO, Y.-J. Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 7, p. 703–710, jul. 2003.
- YIN, J. *et al.* miR-137: a new player in schizophrenia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 3262–3271, 2014.
- YOSHIZAWA, J. M. *et al.* Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 781–791, out. 2013.
- YOUNG, N.; FINDLING, R. L. An update on pharmacotherapy for autism spectrum disorder in children and adolescents. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 1, jan. 2015.
- YOUSUF, S. *et al.* Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. **Brain Research**, v. 1250, p. 242–253, jan. 2009.
- YU, H. *et al.* Neuroprotective effects of viral overexpression of microRNA-22 in rat and cell models of cerebral ischemia-reperfusion injury. **Journal of cellular biochemistry**, v. 116, n. 2, p. 233–41, fev. 2015.
- ZARE JAVID, A. *et al.* The Impact of Resveratrol Supplementation on Blood Glucose, Insulin, Insulin Resistance, Triglyceride, and Periodontal Markers in Type 2 Diabetic Patients with Chronic Periodontitis. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 1, p. 108–114, jan. 2017.
- ZERBO, O. *et al.* Is Maternal Influenza or Fever During Pregnancy Associated with Autism or Developmental Delays? Results from the CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) Study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 43, n. 1, p. 25–33, 5 jan. 2013.
- ZERBO, O. *et al.* Immune mediated conditions in autism spectrum disorders. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 46, p. 232–236, maio 2015.
- ZHANG, H. *et al.* Resveratrol improves left ventricular diastolic relaxation in type 2 diabetes by inhibiting oxidative/nitrative stress: in vivo demonstration with magnetic resonance imaging. **American Journal of Physiology**, v. 299, n. 4, p. H985-994, out. 2010.
- ZHAO, H. *et al.* MiRNA-424 protects against permanent focal cerebral ischemia injury in mice involving suppressing microglia activation. **Stroke**, v. 44, n. 6, p. 1706–13, 1 jun. 2013.
- ZHOU, H.-J. *et al.* Downregulation of miR-199b promotes the acute spinal cord injury through IKK β -NF- κ B signaling pathway activating microglial cells. **Experimental cell research**, v. 349, n. 1, p. 60–67, 15 nov. 2016.
- ZORTEA, K. *et al.* Resveratrol Supplementation in Schizophrenia Patients: A Randomized Clinical Trial Evaluating Serum Glucose and Cardiovascular Risk Factors. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 73, jan. 2016.
- ZWAIGENBAUM, L.; PENNER, M. Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. k1674, 21 maio 2018.

9 ARTIGO 1 - DISFUNÇÃO IMUNOLÓGICA NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: UM POTENCIAL ALVO TERAPÊUTICO

Disfunção imunológica no transtorno do espectro autista: um potencial alvo terapêutico

Josemar Marchezan^{1,2,3,4}, Iohanna Deckmann^{2,3,4,5}, Eduardo Geyer Arrussul Winkler dos Santos^{2,6}, Rudimar Riesgo^{1,2,4,6,7}.

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e Adolescente, Escola de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Grupo de Pesquisa Translacional do Transtorno do Espectro Autista-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação-INCT-NIM.

⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁶Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁷Departamento de Pediatria, Unidade de Neurologia Infantil, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESUMO

O transtorno do espectro do autista (TEA) é um transtorno complexo do neurodesenvolvimento com etiologia desconhecida e, atualmente, com poucas terapias efetivas. Alterações no sistema imune no TEA têm sido demonstradas tanto em modelos animais como em humanos. Assim, o desequilíbrio imunológico surge como uma possível via para a intervenção farmacológica. Nesta revisão, os estudos foram classificados em dois grandes grupos: 1) pesquisas clínicas cujos autores classificam as drogas utilizadas como possuindo ação primária anti-inflamatória e imunomoduladora: sulforafano, celecoxibe, lenalidomida, pentoxifilina, espironolactona, luteolina, corticosteróides, imunoglobulina oral, imunoglobulina intravenosa, terapia celular, extratos de linfócitos dialisáveis, minociclina e pioglitazona; e 2) outras terapias já utilizadas ou atualmente em estudo no TEA, cujas características iniciais não eram nem anti-inflamatórias nem imunomoduladoras, mas que estudos sugerem que possam ter potencial de imunomodulação durante o tratamento: risperidona, vitamina D, ômega-3, *Ginkgo biloba* e L-carnosina, N-acetilcisteína e terapias de restauração de microbioma.

Esses estudos usaram diferentes metodologias de aquisição de dados e são revisados aqui. Questões como estudos randomizados e controlados com placebo, maior número de participantes, e o uso de biomarcadores para melhorar o tratamento do TEA também são levantadas.

Palavras chave: TEA, autismo, sistema imune, terapia imune, neuroimunes.

Introdução

O transtorno do espectro do autista (TEA) é um transtorno do desenvolvimento e seus principais sintomas são: 1) déficits na comunicação e interação sociais e 2) padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades (ASSOCIATION, 2013). O diagnóstico de autismo (usado aqui como sinônimo de TEA em todo o texto) aumentou dramaticamente nas últimas décadas (GOTTFRIED *et al.*, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014). Em 2018, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou que a prevalência de TEA em 16,8 por 1.000 (uma em 59) crianças com 8 anos, afetando 26,6 em 1.000 meninos e 6,6 em 1.000 meninas (razão de prevalência 4:1) (BAIO *et al.*, 2018). Isso representa um aumento de aproximadamente 150% entre os anos 2000 e 2014 (BAIO *et al.*, 2018), tornando o transtorno um problema de saúde pública (BAXTER *et al.*, 2015; BRENTANI *et al.*, 2013). Estudos na Ásia, Europa e América do Norte descrevem uma prevalência média de TEA em torno de 1% (NORIEGA; SAVELKOUL, 2014).

Apesar do aumento no número de casos, os tratamentos atualmente disponíveis melhoram parcialmente alguns sintomas do TEA, não revertendo completamente todos os seus sintomas (BENVENUTO *et al.*, 2013; MEAD; ASHWOOD, 2015; ROSSIGNOL, 2009), e apenas duas drogas, risperidona e aripiprazol, são aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento dos sintomas disruptivo desses pacientes (KAPLAN; MCCRACKEN, 2012; LECLERC; EASLEY, 2015; MARCUS *et al.*, 2009; MEAD; ASHWOOD, 2015; OWEN *et al.*, 2009). Além disso, outros fatores como 1) o prejuízo individual, com muitas facetas do funcionamento diário afetado (MASI *et al.*, 2017), 2) o substancial efeito econômico direto e indireto dos tratamentos e 3) o sofrimento da família reforçam a necessidade da busca contínua por intervenções eficazes (BUESCHER *et al.*, 2014; KARST; VAN HECKE, 2012; MARCHEZAN *et al.*, 2017; SMITH; GREENBERG; MAILICK, 2014; WEISS *et al.*, 2012).

O TEA é uma desordem do desenvolvimento complexa (NORIEGA; SAVELKOUL, 2014), e embora várias definições e avanços tenham sido feitas, os aspectos etiológicos permanecem obscuros (GOTTFRIED *et al.*, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014). No entanto, a contribuição de fatores genéticos e ambientais para os sintomas é consenso na comunidade científica, não deixando dúvidas sobre o aspecto multifatorial do transtorno. (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MCDOUGLE *et al.*, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

A disfunção imunológica tem sido uma característica reconhecida no TEA há várias décadas e tem sido destacada em revisões recentes (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014). Em 1976, um estudo descreveu que 5 de 13 crianças com autismo tinham títulos de anticorpos indetectáveis, apesar da vacina anterior para rubéola, enquanto todos os indivíduos controle tinham títulos detectáveis, fazendo a primeira sugestão de uma ligação entre o sistema imunológico e TEA (GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; STUBBS, 1976). Nas últimas décadas, estudos em modelos animais e humanos mostraram evidências de alterações no funcionamento do sistema imunológico central e periférico no autismo, incluindo alterações na estimulação de células imunes, na geração de auto-anticorpos, desequilíbrio de citocinas/quimiocinas e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014). Interessantemente, muitos estudos também demonstraram uma correlação entre os sintomas do TEA e os níveis de citocinas (AL-AYADHI, 2005; AL-AYADHI; MOSTAFA, 2012, 2013, ASHWOOD *et al.*, 2008, 2011a, 2011b; CAREAGA *et al.*, 2017; EL-ANSARY *et al.*, 2016; EL GOHARY *et al.*, 2015; ENSTROM *et al.*, 2008; FERGUSON *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2017; JYONOUCHI *et al.*, 2005; JYONOUCHI; GENG; DAVIDOW, 2014; MAKINODAN *et*

al., 2017; NAPOLIONI *et al.*, 2013; RICCI *et al.*, 2013; ROSE; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2016; YANG *et al.*, 2015), níveis de imunoglobulinas (IgM e IgG) (HEUER *et al.*, 2008), expressão de antígeno D8/17 de linfócitos B (HOLLANDER *et al.*, 1999), anticorpos séricos antineuronais (GOINES *et al.*, 2011; MOSTAFA; AL-AYADHI, 2012a; PIRAS *et al.*, 2014), anticorpos anti-gangliosídeo M1 (MOSTAFA; AL-AYADHI, 2011) e anticorpos maternos (BRAUNSCHWEIG *et al.*, 2012; PIRAS *et al.*, 2014). Esses dados suportam a hipótese de que um subgrupo de indivíduos com TEA apresenta alguma forma de desregulação do sistema imune e que, pelo menos em parte, essa desregulação possa contribuir para o fenótipo autista (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

Muitos pesquisadores sugerem a possibilidade de que a disfunção imune no TEA possa ser um alvo viável de intervenção farmacológica, e que um subgrupo de indivíduos com autismo poderiam se beneficiar de terapias imunes (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; ESTES; MCALLISTER, 2015; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; LACIVITA *et al.*, 2017; MCDUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; MELTZER; VAN DE WATER, 2017; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014). Esta revisão tem como objetivo descrever drogas que agem sobre o sistema imunológico e foram estudadas em pacientes com TEA.

Métodos

Os ensaios clínicos descritos nesta revisão foram obtidos através da procura no banco de dados PubMed usando os termos e palavras chave: “*autism*”, “*autistic*”, “*autistic spectrum disorder*”, “*ASD*”, “*Rett*”, “*Asperger*”, “*Pervasive Developmental Disorder*” and “*PDD*” associado aos termos “*treatment*”, “*inflammation*”, “*immunological drugs*”, “*immune*”, “*inflammation*”, “*inflammatory*”, “*anti-inflammatory*”, “*immunomodulation*”, “*immunology*”, “*immunological*”, “*neuroinflammation*”, “*neuroinflammatory*”, “*antibody*”, “*antibodies*”,

“immunoglobulin”, “lymphocyte”, “glial activation”, “cytokine”, “immunomodulatory”, “BDNF”, “sulforaphane”, “pregnenolone”, “celecoxib”, “immunoglobulin”, “ACTH”, “lenalidomide”, “pentoxifylline”, “pioglitazone”, “spironolactone”, “corticosteroids”, “probiotics”, “luteolin”, “transplant”, “stem cells”, “cell therapy”, “autologous”, “vitamin D”, “risperidone”, “naloxone”, “minocycline” and “lymphocyte extract”. A pesquisa incluiu os artigos em inglês, espanhol e português, somente estudos conduzidos em humanos e sem limite de data de publicação.

Descrição das constatações relacionadas à disfunção imunológica no TEA e potenciais terapias.

A inclusão de artigos nesta revisão baseou-se nos critérios de classificação dos artigos originais, que consideraram mecanismos de ação anti-inflamatórios ou imunomoduladores das terapias no TEA: 1) Pesquisa clínica cujos autores classificam as drogas utilizadas contendo ação primária anti-inflamatória e imunomoduladora, com as seguintes terapias: sulforafano, celecoxibe, lenalidomida, pentoxifilina, espironolactona, luteolina, corticosteróides, imunoglobulina oral, imunoglobulina intravenosa, terapia celular, extratos de linfócitos dialisáveis, minociclina e pioglitazona (Tabela 1). Os efeitos colaterais dessas terapias, descritos nesses estudos, encontram-se na Tabela 2; e 2) outras terapias já utilizadas ou atualmente em estudo no autismo cujas características iniciais não eram nem anti-inflamatórias nem imunomoduladoras, mas potencialmente desempenham essa capacidade durante o tratamento: risperidona, vitamina D, ômega-3, *Ginkgo biloba*, L-carnosina, N- acetilcisteína e terapias de restauração de microbioma.

Sulforafano

Sulforafano é um isotiocianato derivado de vários vegetais *Brassica* (especialmente o brócolis) (TAROZZI *et al.*, 2013) com atividade anticâncer (JUGE; MITHEN; TRAKA, 2007) e potencial efeito protetivo em doenças neurodegenerativas (TAROZZI *et al.*, 2013). Seu efeito terapêutico baseia-se na regulação positiva da

transcrição gênica relacionada aos mecanismos de proteção contra estresse oxidativo, inflamação, dano ao DNA e radiação (SINGH *et al.*, 2014).

Um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo avaliou o efeito do sulforafano por até 18 semanas em 40 pacientes do sexo masculino com TEA (26 tratados com sulforafano e 14 tratados com placebo), na dose de 50-150 μmol por dia. No grupo tratado, a média do escore da escala *Aberrant Behavior Checklist* (ABC) diferiu em 4, 10 e 18 semanas em comparação com o escore basal, e especialmente em 18 semanas, houve uma diminuição de 34% na pontuação ABC e 17% na escala *Social Responsiveness Scale* (SRS). Melhora significativa foi observada nas subescalas irritabilidade, letargia, estereotipia e hiperatividade da ABC, e nas subescalas consciência social, comunicação social, motivação social e comportamentos repetitivos da SRS. Após a suspensão do tratamento com sulforafano, ambas as escalas tenderam a retornar ao escore basal. Na análise da *Clinical Global Impression Improvement Scale* (CGI-I) com 18 semanas de tratamento, pacientes que usaram sulforafano estavam muito melhor na interação social, comunicação verbal e comportamento atípico comparado aos pacientes que receberam placebo. O uso do sulforafano foi seguro e bem tolerado, porém houve um aumento de peso maior do que no grupo placebo. Dois participantes tiveram crises epiléticas únicas não provocadas e sua relação com o uso de sulforafano não pôde ser descartada. É possível que as crises tenham ocorrido como reflexo de um efeito adverso do sulforafano (SINGH *et al.*, 2014). Após 2 anos, os pacientes foram novamente contatados. Entre 16 pacientes, uma família relatou uma melhora comportamental mantida mesmo após a descontinuação do uso do sulforafano, e nove famílias continuavam fazendo uso da substância e mantendo melhora (LYNCH *et al.*, 2017).

Celecoxibe

Celecoxibe é um anti-inflamatório não esteroideal que age reduzindo a ativação da COX-2 e inibindo a via NF-kB (ARIAS-NEGRETE; KELLER; CHADEE, 1995; SAREDDY *et al.*, 2012). Celecoxibe foi usado como terapia adjuvante no tratamento de TEA num estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo. Quarenta crianças foram aleatoriamente alocadas para receber celecoxibe + risperidona ou placebo + risperidona por 10 semanas. A dose utilizada foi de 200 mg/dia para pacientes com peso inferior a 30 kg e 300 mg/dia para pacientes com mais de 30 kg. Na semana 10, o grupo

risperidona + celecoxibe demonstrou melhora significativas nas subescalas ABC irritabilidade, interação social e no comportamento estereotipado quando comparado à risperidona + placebo. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação aos sintomas extrapiramidais ou outros efeitos colaterais (ASADABADI *et al.*, 2013).

Lenalidomida

Lenalidomida é um análogo da talidomida usado em síndromes mielodisplásicas e mais recentemente para terapia após transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (PULTE *et al.*, 2018). Este medicamento tem menor toxicidade e maior potência moduladora do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e outras citocinas do que a talidomida. A lenalidomida surge como possível tratamento em pacientes com níveis elevados de TNF- α no soro ou líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como de interleucina 1 (IL-1), IL-6 ou proteína 1 de ligação ao metil-CpG (MeCP-1) (CHEZ *et al.*, 2012).

Um estudo aberto foi conduzido com 7 indivíduos com TEA do sexo masculino com idades entre 6 e 12 anos e com níveis elevados de TNF- α no LCR (> 50 pg/ml) para avaliar os efeitos da lenalidomida 2,5 mg/dia por 12 semanas, com avaliações nas semanas 6 e 12. No final do estudo, os níveis de TNF- α do soro e LCR reduziram em 57%, mas esta redução não atingiu significância estatística. Seis crianças que completaram o seguimento de 6 semanas mostraram diminuição dos sintomas do autismo nas escalas *Childhood Autism Rating Scale* (CARS), CGI linguagem expressiva, CGI linguagem receptiva, mas não houve variação na *One-Word Receptive Language Testing Scores* (ROWPVT). Com 12 semanas de tratamento houve aumento da resposta positiva na CGI linguagem expressiva, mas a CGI linguagem receptiva e a CARS mostraram valores semelhantes. As diferenças nos escores de habilidades sociais não foram significativas em comparação ao início do tratamento. Três pacientes foram retirados do estudo por efeitos colaterais, e após a suspensão do uso, os sintomas desapareceram (CHEZ *et al.*, 2012).

Pentoxifilina

Pentoxifilina (PTX) é um análogo da xantina conhecido como inibidor da fosfodiesterase (KRETH *et al.*, 2010) com efeito modulador no TNF- α , IL-10 e interferon gama (IFN- γ) (DOLATABADI *et al.*, 2017), sendo proposto como um potencial tratamento para pacientes com TEA nos anos 70 e 80. Gupta *et al.* descreveram 5 séries de caso numa revisão de 1996 (GUPTA, 2000; GUPTA; RIMLAND; SHILLING, 1996):

- 1) Vinte e três crianças com TEA foram tratadas com PTX (150-600 mg/dia por via oral). Dentro de um mês de terapia, a droga foi considerada “notavelmente eficaz” em 10 casos, “razoavelmente eficaz” em oito casos, “levemente eficaz” em três casos e “não teve efeito” em dois pacientes. Os efeitos colaterais incluíram náuseas, vômitos, hipotensão arterial e cefaleia num pequeno número de pacientes (SOGAME S, 1978);
- 2) Trinta crianças com TEA foram avaliadas após receber PTX (sem dosagem ou duração do tratamento especificado). Seis pacientes (20%) apresentaram melhora acentuada no comportamento e 14 (47%) apresentaram melhora leve dos sintomas (NAKANE A, 1980);
- 3) Shimoide tratou com PTX 20 pacientes masculinos com TEA (a maioria dos pacientes recebeu 200 mg/dia) por 3 meses. Os pacientes foram avaliados pela *Seiken's Critical List for Autistic Children* e pelo comportamento em situações específicas. Em 35% dos pacientes, houve melhora em pelo menos duas das três avaliações. Os efeitos colaterais foram limitados ao trato gastrointestinal (SHIMOIDE M, 1981);
- 4) O tratamento de 18 crianças psicóticas e duas crianças com TEA (um menino de 5 anos e uma menina de 7 anos) com PTX (200 mg/dia na maioria dos pacientes) durante 4 a 10 meses revelaram melhoras “altamente positivas” no comportamento (12 crianças) e na linguagem (14 crianças). Nas crianças com TEA, observou-se melhora na pronúncia de sílabas e palavras. Os efeitos colaterais incluíram agitação (três pacientes) e distúrbios do sono (dois pacientes), que desapareceram sem a interrupção da PTX (TUREK S, 1981);
- 5) PTX foi administrada a 20 crianças com autismo infantil precoce na dose de 10 a 15 mg/kg/dia, divididas em duas doses durante 3 meses, com o objetivo de avaliar as mudanças na atividade do eletroencefalograma (EEG) por meio de um software de análise auto regressivo (ARASIS). A comparação do EEG antes e depois da PTX mostraram diferenças significativas em 7 (39%) de 18 pacientes. Houve melhora no “brincar com um amigo” e a “comunicação pessoal num teste psicopatológico” (SUZUKI M; NAKASHITA Y; OGAWA T, 1984).

Um ensaio clínico, duplo-cego e controlado por placebo administrou, para 2 grupos de quarenta pacientes, PTX + risperidona ou risperidona + placebo por 10

semanas. Houve avaliações pré tratamento e nas semanas 2, 4, 6, 8 e 10. A dose de PTX foi de 400 mg/dia para crianças entre 10 e 40kg e 600mg para crianças com peso acima de 40kg. O grupo risperidona + PTX demonstrou melhora significativamente maior em todas as subescalas ABC. Não houve diferença nos sintomas extrapiramidais ou no efeitos adversos (AKHONDZADEH *et al.*, 2010).

Espironolactona

A espironolactona é um esteróide sintético, pertencente à classe de drogas "diuréticos poupadores de potássio" e conhecida como um antagonista competitivo da aldosterona com potentes propriedades anti-inflamatórias, imunológicas e modificadoras hormonais (BENDTZEN; HANSEN; RIENECK, 2003; KATO *et al.*, 2014; MIURA *et al.*, 2006a, 2006b; PÉREZ *et al.*, 2016). Tem sido utilizada para acne, hirsutismo e puberdade precoce, demonstrando segurança e tolerabilidade (BRADSTREET *et al.*, 2007). Bradstreet *et al.* (2007) relataram um caso de um menino de 12 anos com TEA, desregulação imune, alergias alimentares e níveis elevados de testosterona. Ele demonstrou reduções significativas na gravidade e frequência de vários sintomas disruptivos durante quatro semanas de administração diária de espironolactona na dose de 2 mg/kg. Comparando os escores da escala ABC antes e após o uso de espironolactona, houve uma melhora de 79% na irritabilidade, 93% na letargia, 60% na estereotipia, 72% na hiperatividade e 67% na fala inadequada. Conforme a escala *Peabody Picture Vocabulary Test III* (PPVT-III) houve um ganho na linguagem receptiva compatível com 21 meses, indicando um aumento no vocabulário maior que de um desvio padrão em qualquer nível de idade avaliado (BRADSTREET *et al.*, 2007).

Luteolina

A luteolina é um flavonoide natural com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo encontrada em uma infinidade de plantas (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). Fontes alimentares de luteolina incluem cenouras, pimentões, orégano e azeite (LÓPEZ-LÁZARO, 2009). Em humanos, foi demonstrado que a luteolina inibe a secreção de mediadores pró-inflamatórios a partir de mastócitos (KEMPURAJ *et al.*, 2005).

Em um estudo, 37 crianças com TEA (29 meninos e 8 meninas, com idades entre 4 e 14 anos) receberam uma formulação de flavonoides na dieta (NeuroProtek®) contendo principalmente luteolina (100 mg). 75,67% dos indivíduos tiveram melhora na cor, forma ou cheiro das fezes; 51,35% tiveram menos "problemas alérgicos"; 40,54% começaram a ter melhor contato visual; 40,54% mostraram mais retenção de aspectos aprendidos; 37,83% tiveram mais interação social; 32,43% melhoraram atenção; e 10,81% melhoraram em falar palavras ou frases. Este estudo não possuía nenhum instrumento psicométrico específico ou uma avaliação independente por um avaliador externo. Os autores não esclarecem a duração do tratamento ou seguimento (THEOHARIDES; ASADI; PANAGIOTIDOU, 2012).

Outro estudo aberto avaliou o mesmo suplemento dietético (100 mg de luteolina) em 42 meninos e 8 meninas com idades entre 4 e 10 anos, por um período de 26 semanas. Os desfechos primários foram escores em três domínios (comunicacional, atividade de vida cotidiana e social) da *Vineland Adaptive Behavior Scale* (VABS). Os desfechos secundários foram os escores das escalas ABC, *Autism Treatment Evaluation Checklist* (ATEC) e CGI-I. Houve melhora significativa no funcionamento adaptativo (comunicação, habilidades de vida diária e social), medido pela VABS, bem como no comportamento geral, indicado pela redução nas pontuações da escala ABC. Houve um período transitório (1-8 semanas) de aumento da irritabilidade em 27 dos 50 participantes. (TALIOU *et al.*, 2013).

Num estudo de 2015, 40 pacientes com TEA receberam formula dietética contendo luteolina por 26 semanas, reduzindo os sintomas do TEA e níveis séricos de TNF- α e IL-6. Inicialmente os níveis de IL-6 estavam elevados em indivíduos com TEA (sem significância estatística); enquanto os de TNF- α foram significativamente maiores nos pacientes com TEA. Curiosamente, havia dois subgrupos de indivíduos com TEA neste estudo: com baixos e altos níveis séricos de IL-6 e TNF- α . O último grupo (n = 10) teve melhora significativa nas pontuações do VABS para todos os domínios; o escore composto do VABS também foi significativamente maior. Em 26 semanas de tratamento, os pacientes com TEA melhoraram em vários domínios comportamentais equivalentes a 9,73 meses no domínio da comunicação, 8,09 meses no domínio social e 6,64 meses nas habilidades de vida diária (TSILIONI *et al.*, 2015).

Em um estudo recente, a associação de palmitoiletanolamida + luteolina (700 mg + 70 mg duas vezes ao dia por um ano) foi administrada a um paciente autista de 10 anos de idade. A avaliação com o questionário ATEC mostrou uma diminuição nos escores, mostrando melhora nos resultados comportamentais. O tratamento reduziu os comportamentos estereotípicos, melhorou significativamente o domínio cognitivo (observado por pais e professores) e, curiosamente, diminuiu a enurese do indivíduo após 14 meses de tratamento (BERTOLINO *et al.*, 2017).

Corticosteróides

Os corticosteroides são drogas anti-inflamatórias que inibem a secreção de mediadores pró-inflamatórios, alteram a atividade das células T e também podem interferir na ativação da micróglia (SCHWEINGRUBER *et al.*, 2012). Um estudo retrospectivo com prednisona oral (2 mg/kg/dia por 9-12 meses) avaliou os pacientes com TEA através da escala *Clinical Language Status Questionnaire* (CLSQ), Resposta Evocada Auditiva Modulada por Frequência (FMAER) e EEG. Para o grupo tratado (20 participantes) 9/14 eletrodos avaliados para a FMAER à 4Hz tiveram modificação estatisticamente significativa, mais importante no eletrodo temporal pósteroinferior esquerdo (TP9). Por outro lado, nenhuma diferença foi observada no grupo controle (24 indivíduos não tratados). Os EEG dos grupos tratado e controle não mostraram diferenças. Grupo tratado com esteróide também teve um aumento significativo na média CLSQ após a terapia (DUFFY *et al.*, 2014).

Shenoy *et al.* relataram resposta à terapia com esteróides em um caso de autismo secundário à uma síndrome autoimune. O paciente foi tratado com diferentes regimes de prednisolona oral, com uma dose média de 0,5 mg/kg/dia. Os sintomas de TEA melhoraram progressivamente durante o período de um ano após o término da terapia com corticosteroides (SHENOY; ARNOLD; CHATILA, 2000). Em um estudo semelhante, uma criança com regressão de linguagem e de comportamento aos 22 meses de idade (diagnosticada posteriormente com Transtorno Global do Desenvolvimento) recebeu prednisona (2mg/kg/dia) por 28 semanas. Foram observados melhora da fala, melhora da responsividade à comunicação verbal, melhora nas relações sociais e diminuição de estereotípias motoras (STEFANATOS; GROVER; GELLER, 1995).

Morderkar e colaboradores descrevem 2 pacientes com diagnóstico de Transtorno Desintegrativo da Infância que também foram tratados com corticosteroides, apresentando melhora clínica semelhante. Após 2 mg/kg de tratamento diário com prednisona, o primeiro paciente apresentou recuperação da fala no 11º dia de terapia. O segundo sujeito, com tratamento de uma semana na mesma dose, apresentou melhora progressiva da fala ao longo de 48 meses (MORDEKAR *et al.*, 2009).

Na década de 90, vários estudos foram realizados com Org 2766, um Análogo Sintético do Hormônio Adrenocorticotrófico (4-9). No entanto, Org 2766 não possui atividade esteroidogênica substancial e exerce seus efeitos através de uma interação com sistemas opioides endógenos (BUITELAAR *et al.*, 1990, 1992a, 1992b, 1996; VERBATEN *et al.*, 1996). Outro estudo aberto com o neuroesteróide pregnenolona encontrou melhora nos pacientes com TEA. Considerando que este fármaco não alterou os níveis de cortisol, os autores sugerem que a pregnenolona atuaria através da modulação dos receptores GABA_A, alterando a relação de excitação/inibição em sistemas neurais chave (FUNG *et al.*, 2014; MARX *et al.*, 2009).

Imunoglobulina Oral

A imunoglobulina oral, constituída predominantemente por IgG, é um medicamento preparado a partir de imunoglobulinas obtidas de soro humano e bovino ou leite bovino. Vários estudos demonstram sua sobrevivência à exposição gástrica e resistência à digestão proteolítica no trato gastrointestinal (JASION; BURNETT, 2015).

Schneider *et al.* administraram imunoglobulina oral em um estudo piloto com 12 indivíduos com TEA, considerando a hipótese de que os distúrbios gastrointestinais crônicos no TEA seriam secundários à deficiência na imunidade da mucosa. Após quatro semanas, 50% dos indivíduos apresentaram melhora nos sintomas gastrointestinais (SCHNEIDER *et al.*, 2006).

Similarmente, Handen *et al.* testaram a eficácia da imunoglobulina humana oral em sintomas gastrointestinais no TEA. Cento e vinte e cinco crianças com TEA foram tratadas com diferentes doses de imunoglobulina (140 mg/dia, 420 mg/dia ou 840 mg/dia) ou placebo. O desfecho primário foi avaliado pela *Modified Global Improvement Scale*

(MGIS), que não apresentou diferenças significativas entre os grupos (HANDEN *et al.*, 2009).

Imunoglobulina intravenosa

Imunoglobulina intravenosa (IVIG) é um tratamento que contém um conjunto de várias moléculas de IgG do plasma humano (mais de 95% de IgG não modificada) (RÜTTER; LUGER, 2001). Embora seja amplamente utilizado, o mecanismo de ação da IVIG para o tratamento de doenças autoimunes ainda não está claro (MCDUGLE *et al.*, 2015).

Um ensaio clínico com 12 crianças com autismo do sexo masculino que receberam uma dose única de IVIG (0,4 g/kg) ou placebo e foram avaliadas após 6 ou 13 semanas de tratamento. Houve melhora significativa da irritabilidade, hiperatividade, contato visual inadequado e fala inadequada na escala ABC, além de melhores escores na sonolência. Não houve efeitos colaterais causados pelo tratamento (NIEDERHOFER; STAFFEN; MAIR, 2003).

Em um ensaio clínico aberto, 5 crianças diagnosticadas com autismo receberam infusões mensais de IVIG na dose de 400 mg/kg por 6 meses. Não houve melhora e efeitos colaterais não são citados (DELGIUDICE-ASCH *et al.*, 1999). Em outro estudo aberto, 10 crianças com TEA e anormalidades imunológicas (como aumento da porcentagem de linfócitos que expressam o antígeno DR) receberam de uma a seis infusões de IVIG de 154 a 375 mg/kg, de acordo com o paciente. Em 5 casos, nenhuma melhora foi percebida; em 4 casos, os pais notaram uma leve melhora na atenção e hiperatividade, mas não houve diferenças nos sintomas nucleares do autismo. Uma criança de 5 anos de idade que recebeu infusões de 375 mg/kg teve um alívio notável dos sintomas autistas (por exemplo, começou a falar pela primeira vez). Não houve efeitos adversos. (PLIOPLYS, 1998).

Um recente estudo piloto investigou a eficácia e tolerabilidade da IVIG através de dez infusões de 1 g/kg a cada 21 ± 7 dias em 14 pacientes com TEA e desequilíbrio imunológico (por exemplo, disfunção de células T ou B, infecções recorrentes, entre outros). A melhora nos sintomas comportamentais foi medida através das escalas SRS, PPVT, *Children's Communication Checklist-2* (CCC-2), ABC and *Autism Diagnostic*

Observation Scale (ADOS). Na SRS, houve melhora significativa no escore global, de maneirismos, de cognição social e motivação social. In CCI-2, avanços na fala e domínio semântico foram reportados. Não houve alterações na escala ABC. Por outro lado, os escores da escala ADOS mudaram significativamente nos comportamentos estereotipados e interesses restritos, na comunicação e interação social e na interação social recíproca. Em relação aos marcadores imunológicos após o tratamento, houve alterações no TNF- α e na IL-1 β . Os eventos adversos à IVIG incluíram cefaleias de leve intensidade e reações no local da infusão (MELAMED *et al.*, 2018).

Terapia Celular

Conceitualmente, a terapia celular com células-tronco hematopoiéticas (CTH) - como derivadas de cordão ou de medula óssea - pode ajudar no equilíbrio da cascata inflamatória através da regulação imunológica (SINISCALCO; BRADSTREET; ANTONUCCI, 2013). Um ensaio aberto estudou 36 pacientes com TEA tratados com placebo, Células Mononucleares de Sangue de Cordão (CBMNC) ou a combinação de Células-Tronco Mesenquimais Derivadas do Cordão Umbilical (UCMSCs) + CBMNC. O único evento adverso relatado durante o período de acompanhamento foi febre baixa autolimitada em cinco indivíduos no grupo de tratamento combinado. Do mesmo modo, não ocorreram anomalias hepáticas, renais, hematológicas e metabólicas significativas após a terapêutica. Com 24 semanas pós tratamento ambos os grupos de intervenção mostraram melhora significativa nos escores da CARS e ABC em comparação aos valores de base, e o grupo de tratamento combinado apresentou melhores resultados do que o grupo CBMNC. Diferenças estatisticamente significativas também foram observadas na avaliação da CGI nos dois grupos de tratamento em comparação com os controles em 24 semanas pós-tratamento (LV *et al.*, 2013).

A eficácia e segurança da terapia com Células Tronco Fetais (FSC) foi verificada em 45 indivíduos com TEA através dos escores ATEC e ABC, além de exames laboratoriais. Após 6 meses de terapia, a contagem de células B diminuiu significativamente, enquanto as contagens de CD3 e CD4 aumentaram 12 meses após o tratamento. Uma redução significativa na pontuação geral da ATEC foi observada 12 meses após a terapia e escores totais da ABC nos sexto e décimo segundo meses. Nenhum efeito colateral foi observado (BRADSTREET *et al.*, 2014).

Inicialmente, Sharma *et al.* utilizaram Células Mononucleares de Medula Óssea Autólogas (BMMNCs) por via intratecal em um menino de 14 anos. Foi observada melhora sintomática, com mudança na escala CARS de autismo severo para não autista, e verificado um aumento da função cerebral por tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) (SHARMA *et al.*, 2013a). Posteriormente, realizaram um estudo aberto para prova de conceito utilizou o transplante intratecal de BMMNCs em associação com terapia comportamental em 32 pacientes com TEA. Houve diferença significativa entre os escores CGI-I pré e pós-tratamento e os escores totais da *Indian Scale for Assessment of Autism* (ISAA). Todos os domínios do ISAA também apresentaram decréscimos significativos. Os escores da *Functional Independence Measure* (FIM) e do *Wee-FIM* não apresentaram diferença. A PET-CT detectou alterações no metabolismo da glicose em diferentes regiões cerebrais. Crises epilépticas e eventos adversos menores, como cefaleia, náusea, vômito e dor relacionada ao procedimento foram relatados (SHARMA *et al.*, 2013b).

Um ensaio aberto avaliou os efeitos da administração intratecal da terapia celular com Concentrado de Medula Óssea Autóloga (BMAC) em 10 indivíduos com autismo. A pontuação média de ISAA dos pacientes diminuiu (melhorou) 8% nos primeiros 3 meses após a infusão do BMAC e diminuiu mais 6% no período de 3 para 6 meses. As alterações de pontuação do *Wee-FIM* não alcançaram significância estatística. Os pacientes não apresentaram reações adversas (BANSAL *et al.*, 2016).

Outro ensaio clínico aberto testou a segurança e a viabilidade da infusão de Sangue de Cordão Autólogo a 25 crianças com TEA. Melhoras significativas no comportamento foram encontradas em uma ampla gama de medidas de resultado: VABS-II, CGI-I, *Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory* (PDDBI) e *Expressive One-Word Picture Vocabulary Test-4* (EOWPVT). A maioria das alterações comportamentais observadas ocorreu durante os primeiros 6 meses e foram mantidas entre 6 e 12 meses. QI não-verbal mais alto foi associado a maiores ganhos. O *Eye-Gaze Tracking* mostrou um aumento de 20% na chance de as crianças olharem os olhos de uma atriz. Eventos adversos leves foram observados: reações alérgicas à infusão, alterações na pele, agitação e infecções comuns na infância (DAWSON *et al.*, 2017).

Por fim, um relato de série de casos descreveu melhora em 3 crianças com autismo após a infusão de Células-Tronco Embrionárias Humanas (hESCs). Melhora na comunicação, na atenção ao olhar e no desempenho cognitivo foram observadas.

Verificou-se também aumento na perfusão sanguínea cerebral refletida no PET-CT. Não foram observados efeitos colaterais (SHROFF, 2017).

Extratos de linfócitos dialisáveis

Os extratos de linfócitos dialisáveis (DLE) são complexos de substâncias de baixo peso molecular com possível ação de transferência de imunidade mediada por células, principalmente devido à ação de pequenos peptídeos chamados “fatores de transferência” (ARNAUDOV; KOSTOVA, 2015). Um estudo publicado em 1996 relatou o acompanhamento de quarenta pacientes de 5 anos de idade com autismo infantil clássico e pseudo-autismo após três anos e meio de terapia com DLE. Vinte e oito pacientes apresentaram melhora e 10 apresentaram remissão de sintomas autistas. O artigo não esclarece os critérios usados para definir autismo e pseudo-autismo (FUDENBERG, 1996).

Minociclina

A minociclina é um antibiótico da família das tetraciclinas com potentes efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores (ROSENBLAT; MCINTYRE, 2018; SOCZYNSKA *et al.*, 2012). O mecanismo imunomodulador exato da minociclina não está claro (KIM; SUH, 2009). A minociclina diminui a ativação microglial, modula as vias envolvidas na neuroinflamação, como as redes de citocinas e quimiocinas (por exemplo, IL-6, IL-1 β e TNF- α) e reduz a atividade de algumas metaloproteinases (ORSUCCI *et al.*, 2009; YONG *et al.*, 2004). Ensaios clínicos em pacientes com síndrome do X-frágil demonstraram que a minociclina é eficaz e segura na melhora da função comportamental (LEIGH *et al.*, 2013; PARIBELLO *et al.*, 2010).

Um estudo piloto avaliou onze crianças com autismo tratadas com minociclina (1,4 mg/kg/dia) + vitamina B6 (0,6 mg/kg, para prevenir os potenciais efeitos colaterais vestibulares) (PARDO *et al.*, 2013). A melhora clínica foi insignificante, com as pontuações do CGI-S permanecendo estáveis e apenas duas das dez crianças demonstrando "pouco melhor" no CGI-I. As pontuações compostas do VABS também mostraram pouca ou nenhuma mudança. Os eventos adversos relatados pelos pais incluíram: sintomas gastrintestinais e respiratórios superiores, hematúria, ganho de peso,

pica, hiperatividade, infecção do trato urinário, otite média, epistaxe, coloração de dentes, aumento da agressividade, auto-agressividade, sensibilidade à luz, aumento do apetite e aumento dos rituais. As avaliações laboratoriais demonstraram alterações significativas no perfil de expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator de crescimento hepático (HGF) no LCR e no soro. Entre as citocinas avaliadas, apenas a IL-8 foi significativamente reduzida no soro após o tratamento, sem alterações no LCR. Não foram observadas alterações significativas pré e pós-tratamento nos perfis das metaloproteinases do plasma.

Ghaleiha *et al.* conduziram um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo com 50 crianças com TEA que receberam minociclina (50 mg duas vezes ao dia) + risperidona ou placebo + risperidona por 10 semanas. A dose de risperidona foi de 1 mg/dia para pacientes com peso inferior a 20 kg e 2 mg/dia para aqueles que pesavam 20 kg ou mais. Uma redução de pontuação significativamente maior nas subescalas irritabilidade e hiperatividade da escala ABC ocorreu no grupo minociclina em comparação com o grupo placebo na semana 10 (GHALEIHA *et al.*, 2016).

Pioglitazone

A pioglitazona pertence ao grupo das tiazolidinedionas e atua por via do receptor PPAR- γ (DEROSA; SAHEBKAR; MAFFIOLI, 2018). Este medicamento é frequentemente usado como agente antidiabético e oferece proteção cardiovascular adicional e melhora do perfil lipídico (YANDRAPALLI; ARONOW, 2017). Os ligantes do PPAR- γ possuem efeitos anti-inflamatórios, regulando negativamente ou positivamente os diferentes componentes da resposta inflamatória (YESSOUFOU; WAHLI, 2010). As tiazolidinedionas foram testadas em distúrbios inflamatórios como a psoríase (YESSOUFOU; WAHLI, 2010) e asma (ROGLIANI *et al.*, 2018). Os efeitos da pioglitazona nas doenças neuropsiquiátricas também foram estudados (NIERENBERG *et al.*, 2018).

Um estudo aberto avaliou o uso de pioglitazona em 25 indivíduos com TEA por 12 a 16 semanas com doses diárias de 30mg (idades 3-5 anos) ou 60mg (idades 6-17 anos de idade). Houve redução significativa em quatro subescalas ABC após a administração de pioglitazona: hiperatividade, irritabilidade, letargia e estereotipia. 76% dos pacientes apresentaram uma redução de 50% em pelo menos uma subescala, e houve uma tendência

dos participantes mais jovens se beneficiarem mais com a pioglitazona. Observaram-se elevações transitórias e autolimitadas nas contagens de leucócitos, níveis de glicose e enzimas hepáticas (BORIS *et al.*, 2007).

Ghaleiha *et al.* conduziram um ensaio clínico duplo-cego controlado por placebo com uso de pioglitazona (30 mg/dia) como tratamento adjuvante à risperidona em 44 pacientes com TEA (idade entre 4 e 12 anos de idade) durante 10 semanas. O grupo da pioglitazona apresentou melhora significativamente maior em três subescalas ABC: hiperatividade, irritabilidade e letargia. A frequência de efeitos adversos foi semelhante entre os grupos intervenção e controle (GHALEIHA *et al.*, 2015).

Risperidone

A risperidona, um antipsicótico atípico, é amplamente utilizada no tratamento de crianças com autismo, diminuindo distúrbios comportamentais nesse transtorno, como irritabilidade, agressividade e ansiedade (MCCRACKEN *et al.*, 2002). Estudos sugerem efeitos imunorreguladores do tratamento com risperidona, uma vez que a risperidona desencadeia várias alterações imunológicas (expressão de citocinas inflamatórias, IL-1 β , TNF- α , entre outras) (BAUMEISTER; CIUFOLINI; MONDELLI, 2016; MACDOWELL *et al.*, 2013; NOTO *et al.*, 2015). No autismo, o tratamento com risperidona foi associado à diminuição dos níveis séricos de Eotaxina e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). Além disso, os valores médios de IL-5 foram significativamente maiores no grupo que respondeu à risperidona do que em não respondedores. (CHOI *et al.*, 2014). Por outro lado, um estudo anterior com indivíduos com TEA não encontrou alterações nos marcadores inflamatórios séricos após o uso da risperidona, apesar da melhoria clínica (TOBIASOVA *et al.*, 2011). Portanto, a associação entre alterações imunológicas e resposta clínica é uma possibilidade que deve ser melhor investigada.

Suplementos

Vitamina D

A deficiência de vitamina D tem sido implicada como um potencial fator ambiental ligado a alguns distúrbios autoimunes e desempenha um papel imunomodulador (MOSTAFA; AL-AYADHI, 2012b; SAAD *et al.*, 2016). Vários estudos encontraram níveis mais baixos de vitamina D em crianças com TEA do que em controles saudáveis (KOČOVSKÁ *et al.*, 2014; MEGUID *et al.*, 2010; TOSTES *et al.*, 2012). Mostafa e Al-Ayadhi sugerem que a deficiência de vitamina D possa estar envolvida na produção de auto-anticorpos em pacientes com autismo (MOSTAFA; AL-AYADHI, 2012b), e Cannell que a vitamina D possa reduzir a gravidade dos sintomas do TEA por meio de ações anti-inflamatórias (CANNELL, 2013). Um relato de caso (JIA *et al.*, 2015), juntamente com ensaios abertos e controlados (FENG *et al.*, 2017; SAAD *et al.*, 2016), observaram a redução dos escores dos sintomas de TEA após suplementação de vitamina D3. No entanto, recentes ensaios clínicos controlados com placebo encontraram resultados divergentes após a suplementação de vitamina D3 no TEA (KERLEY *et al.*, 2017; SAAD *et al.*, 2018).

Omega-3

Os ácidos graxos ômega-3 possuem propriedades anti-inflamatórias e de modulação imunológica (LAYÉ *et al.*, 2018; MADORE *et al.*, 2016; MAZAHERY *et al.*, 2017). Suplementação com ômega-3 diminui a expressão gênica de NF- κ B, IL-12 e IL-13 (SALLAM *et al.*, 2010), proteína-2 inflamatória de macrófagos (MIP2), IL-6 (ZHANG *et al.*, 2015), IL-17A (FARJADIAN *et al.*, 2016) e TNF- α (ALLAM-NDOUL *et al.*, 2016; FARJADIAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2004). Apesar de ser usado amplamente como tratamento alternativo para o TEA (POSAR; VISCONTI, 2016a, 2016b), a suplementação com Omega-3 para crianças com TEA não pode ser recomendada baseado nas evidências atuais (CHENG *et al.*, 2017; HORVATH; ŁUKASIK; SZAJEWSKA, 2017; LI; LI; XIANG, 2017; MAZAHERY *et al.*, 2017; POSAR; VISCONTI, 2016b; SATHE *et al.*, 2017).

Ginkgo biloba

Ginkgo biloba (Ginkgoaceae) é uma antiga planta chinesa com efeito anti-inflamatório (MACLENNAN; DARLINGTON; SMITH, 2002) e um dos fitoterápicos

mais utilizados no mundo (ERNST, 2002). Os efeitos da *Ginkgo biloba* no TEA foram estudados num ensaio aberto (NIEDERHOFER, 2009) e num ensaio clínico duplo-cego e controlado por placebo como adjuvante na terapia com risperidona (HASANZADEH *et al.*, 2012), com 3 e 47 pacientes, respectivamente. Ela se mostrou segura e bem tolerada, mas não demonstrou eficácia em sintomas autistas.

L-Carnosina

L-Carnosina é um dipeptídeo dos aminoácidos β -alanina e l-histidina. É facilmente absorvida no trato digestivo, penetra na barreira hematoencefálica, tem alta biodisponibilidade e ação estabilizadora da membrana. (PROKOPIEVA *et al.*, 2016). Carnosina é conhecida por ser um agente antioxidante e neuroprotetor, (STVOLINSKY *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000) reduzindo a inflamação e a neurodegeneração através da diminuição da síntese de TNF- α e óxido nítrico (FLEISHER-BERKOVICH *et al.*, 2009). Os possíveis efeitos benéficos da L-carnosina nos sintomas de TEA podem ser atribuídos às atividades imunomoduladoras, antioxidantes, glutamatérgicas, moduladoras de NMDA e GABA. (HAJIZADEH-ZAKER *et al.*, 2018). Dois ensaios clínicos randomizados e controlados por placebo estudaram L-carnosina em crianças com TEA na dose de 800 mg/dia. Chez *et al.* avaliaram 31 crianças por 8 semanas e encontraram mudanças em múltiplos domínios no grupo que recebeu carnosina (linguagem receptiva, atenção social e comportamento) (CHEZ *et al.*, 2002). Posteriormente, Hajizadeh-Zaker *et al.* usaram L-carnosina + risperidona ou placebo + risperidona por 10 semanas em 50 crianças. Eles encontraram melhora na subescala ABC hiperatividade no grupo que fez uso da L-carnosina (HAJIZADEH-ZAKER *et al.*, 2018). Um recente ensaio clínico controlado por placebo usando 500 mg de L-carnosina durante 2 meses observou redução na duração do sono, nas parassonias e nos escores de distúrbios do sono, mas não ocorreu mudança no comportamento das crianças com TEA (MEHRAZAD-SABER; KHEIROURI; NOORAZAR, 2018).

N-acetilcisteína

N-acetilcisteína (NAC) é um pré-fármaco de cisteína, biodisponível oralmente e conhecido por seu uso na superdosagem de acetaminofeno (ATKURI *et al.*, 2007). Com propriedades anti-inflamatórias através de vários processos celulares (DEEPMALA *et al.*, 2015), a NAC é um precursor da glutatona e antioxidante direto e, portanto, inibe eventos a montante que levam à ativação do NF- κ B e outras citocinas pró-inflamatórias (DEEPMALA *et al.*, 2015). Em linhagens celulares de macrófagos ativadas por lipopolissacarídeos a NAC atua inibindo as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, em nível proteico e de microRNA (PALACIO; MARKERT; MARTÍNEZ, 2011; PINAR KARAPINAR *et al.*, 2016).

Marler *et al.* relataram um caso de um menino de 4 anos de idade que apresentou melhora na auto-agressividade refratária após o uso de NAC, com os sintomas retornando após o término da medicação e melhorando novamente após seu reinício (MARLER; SANDERS; VEENSTRA-VANDERWEELE, 2014). Outro relato de caso também descreve melhora na agressividade severa em adolescentes após uso de NAC associado à quetiapina (STUTZMAN; DOPHEIDE, 2015). Ghanizadeh relatou ganhos em interação social, comunicação, hiperatividade, interesses restritos e comportamentos agressivos em um menino de 8 anos de idade, após o uso do NAC (GHANIZADEH; DERAKHSHAN, 2012). Um estudo randomizado, controlado por placebo demonstrou uma redução significativa nos sintomas de irritabilidade em 29 crianças com TEA (HARDAN *et al.*, 2012). Além disso, dois ensaios clínicos randomizados controlados por placebo de NAC em conjunto com a risperidona para tratamento da irritabilidade em pacientes com TEA (50 e 40 participantes) também mostraram uma redução significativa nas pontuações da subescala ABC irritabilidade nos grupos tratados com NAC (GHANIZADEH; MOGHIMI-SARANI, 2013; NIKOO *et al.*, 2015). Mais recentemente, dois ensaios randomizados controlados por placebo falharam em encontrar benefício no uso de NAC em crianças com autismo (DEAN *et al.*, 2017; WINK *et al.*, 2016).

Terapias restauradora de microbiomas

Existe uma elevada prevalência de distúrbios gastrointestinais em pacientes com TEA, tais como alterações do hábito intestinal, dor abdominal crônica e flatulência. Curiosamente, os sintomas gastrointestinais não tratados podem piorar os principais sintomas comportamentais. Um mecanismo proposto para esses fenômenos é uma ruptura

no “eixo intestino-cérebro”, uma comunicação entre o sistema nervoso entérico e o sistema nervoso central. Tem sido sugerido que o eixo do intestino-cérebro transmite sinais fundamentais para o neurodesenvolvimento, e que seu mau funcionamento poderia estar associado ao aparecimento de distúrbios neuropsiquiátricos, como o TEA (LI; ZHOU, 2016).

A microbiota intestinal pode ser o agente de ruptura no eixo do intestino-cérebro, através de efeitos indiretos no sistema imune inato. Sugere-se que as alterações no microbioma intestinal estão relacionadas com redução da integridade da barreira intestinal, conduzindo a um aumento da absorção de toxinas (por exemplo, lipopolissacarídeos). Lipopolissacarídeos pode atuar sobre os hepatócitos, induzindo a secreção de TNF- α , que por sua vez estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias sistemicamente, levando, em última instância, à ativação microglial no SNC (DOENYAS, 2018). Portanto, com base nessas afirmações, os pesquisadores sugerem que as estratégias para restaurar o microbioma fisiológico do intestino, como a suplementação com probióticos e o transplante de microbiota fecal, podem ser capazes de melhorar os sintomas gastrointestinais e comportamentais no TEA. (YANG; TIAN; YANG, 2018). Em 2000, Sandler *et al.* descreveram uma série de pacientes com TEA e diarreia crônica. O tratamento com o vancomicina foi bem sucedido em proporcionar melhora a curto prazo em 8 de 10 crianças, mas os ganhos não se mantiveram (CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; SANDLER *et al.*, 2000).

Uma revisão de Kałużna-Czaplińska *et al.* apresentou resultados com suplemento dietético probiótico, que diminuiu o biomarcador urinário fúngico (D-arabinitol) e melhorou a capacidade de concentração e a independência em indivíduos diagnosticados com TEA (KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA; BŁASZCZYK, 2012). Da mesma forma, um estudo aberto publicado em 2017 testou os efeitos da transferência de microbiota fecal em indivíduos com autismo; os autores relataram uma melhora de sintomas gastrointestinais de até 80% e uma melhora significativa dos distúrbios comportamentais. (KANG *et al.*, 2017). Por fim, um ensaio clínico randomizou os sujeitos pediátricos para receber placebo ou suplemento dietético probiótico durante os primeiros 6 meses de vida. Enquanto 6 dos 35 indivíduos do grupo de controle desenvolveram ou Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade ou Síndrome de Asperger mais tarde na vida, nenhum do grupo probiótico teve o mesmo resultado (PÄRTTY *et al.*, 2015).

DISCUSSÃO

O TEA é um transtorno complexo do neurodesenvolvimento (NORIEGA; SAVELKOUL, 2014) e estudos em modelos animais e em humanos demonstram alterações no sistema imune no espectro (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014). Vários trabalhos correlacionam sintomas do TEA e estado imunológico (AL-AYADHI, 2005; AL-AYADHI; MOSTAFA, 2012, 2013, ASHWOOD *et al.*, 2008, 2011a, 2011b; BRAUNSCHWEIG *et al.*, 2012; CAREAGA *et al.*, 2017; EL-ANSARY *et al.*, 2016; EL GOHARY *et al.*, 2015; ENSTROM *et al.*, 2008; FERGUSON *et al.*, 2016; GOINES *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2017; HEUER *et al.*, 2008; HOLLANDER *et al.*, 1999; JYONOUCHI *et al.*, 2005; JYONOUCHI; GENG; DAVIDOW, 2014; MAKINODAN *et al.*, 2017; MOSTAFA; AL-AYADHI, 2011; NAPOLIONI *et al.*, 2013; PIRAS *et al.*, 2014; RICCI *et al.*, 2013; ROSE; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2016; YANG *et al.*, 2015), apoiando a hipótese de que há um subgrupo de indivíduos com TEA que poderia se beneficiar de terapias com ação imunológica (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; ESTES; MCALLISTER, 2015; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; LACIVITA *et al.*, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; MELTZER; VAN DE WATER, 2017; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

A capacidade anti-inflamatória/modulação imunológica tem sido proposta em drogas rotineiramente utilizadas para doenças neurológicas e psiquiátricas, apesar de seu mecanismo original de ação. O aripiprazol, um antipsicótico aprovado pelo FDA para uso no autismo (LECLERC; EASLEY, 2015), exibe propriedades imunológicas em experimentos *in vitro* (SEKI *et al.*, 2013) e na esquizofrenia intensifica a sinalização anti-inflamatória (SOBIŚ *et al.*, 2015). O ácido valpróico, um ácido graxo de cadeia curta usado como estabilizador de humor e antiepiléptico (LENG; CHUANG, 2006), pode ter efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (SONG *et al.*, 2015; SUDA *et al.*, 2013; XIMENES *et al.*, 2013). O papel potencial da transmissão serotoninérgica e dos receptores NMDA na modulação da neuroinflamação também tem sido estudada e

poderia abrir novas perspectivas terapêuticas para abordar os déficits comportamentais no TEA. (CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; LACIVITA *et al.*, 2017). Buspirona (BUITELAAR *et al.*, 1992a; CHUGANI *et al.*, 2016; GHANIZADEH; AYOOBZADEHSHIRAZI, 2015; MCCORMICK, 1997), fluoxetina (ALCAMÍ PERTEJO; PERAL GUERRA; GILABERTE, 2000; CHANTILUKE *et al.*, 2015; FATEMI *et al.*, 1998; HOLLANDER *et al.*, 2005, 2012), escitalopram (OWLEY *et al.*, 2005, 2010), citalopram (KING *et al.*, 2009), sertralina (HELLINGS *et al.*, 1996; MCDUGLE *et al.*, 1998; STEINGARD *et al.*, 1997), D cicloserina (MINSHAWI *et al.*, 2016; POSEY *et al.*, 2004; URBANO *et al.*, 2014, 2015; WINK *et al.*, 2016), amantadina (KING *et al.*, 2001) e memantina (CHEZ *et al.*, 2007; JOSHI *et al.*, 2016; OWLEY *et al.*, 2006) já foram utilizados em pesquisa clínicas no autismo. Finalmente, o naltrexone, um potente antagonista opioide que já foi testado no TEA (BARRETT; FEINSTEIN; HOLE, 1989; BOUVARD *et al.*, 1995; CAMPBELL *et al.*, 1990, 1993; FELDMAN; KOLMEN; GONZAGA, 1999; GONZALEZ *et al.*, 1994; KNABE; SCHULZ; RICHARD, 1990; KOLMEN *et al.*, 1995, 1997; LEBOYER *et al.*, 1992; WALTERS *et al.*, 1990; WILLEMSSEN-SWINKELS *et al.*, 1995b, 1995a, 1999; WILLEMSSEN-SWINKELS; BUITELAAR; VAN ENGELAND, 1996; WILLIAMS *et al.*, 2001; ZINGARELLI *et al.*, 1992) também poderia ter ação imunomoduladora (SCIFO *et al.*, 1996).

Atualmente, nenhuma terapia disponível pode reverter os principais sintomas do autismo. O uso de terapias baseadas no sistema imunológico pode ser uma possível via de tratamento para alguns indivíduos, mas poucos estudos direcionados à imunomodulação foram realizados em pacientes com TEA. Esses estudos abrangem uma ampla variedade de classes de medicamentos, incluindo produtos vegetais, suplementos alimentares, probióticos, antibióticos, agentes anti-inflamatórios, imunomoduladores, terapias celulares e até substâncias curiosas, como o leite de camela. (AL-AYADHI *et al.*, 2015; BASHIR; AL-AYADHI, 2014). A maioria desses estudos consiste em relatos de casos ou ensaios abertos, sem grupo controle. Poucos ensaios são controlados por placebo e têm um número suficiente de participantes para gerar resultados confiáveis. A heterogeneidade das populações estudadas (considerando idade, origem étnica e gravidade dos sintomas), a disparidade nos critérios diagnósticos de TEA e a variedade de instrumentos de avaliação psicológica dificultam a comparação de diferentes achados. Além disso, muitos dos trabalhos mostram importantes falhas metodológicas. Resultados discrepantes entre diferentes estudos sobre a mesma terapia também são frequentes, e os

sintomas de TEA que mostraram melhora variam consideravelmente entre um trabalho e outro. Por último, há poucas publicações sobre cada intervenção, portanto, mais estudos são necessários para obter dados consistentes.

Também é possível que apenas parte dos pacientes incluídos nos estudos realizados apresentasse disfunção imunológica contribuindo para a etiologia dos sintomas. Assim, mesmo que tais pacientes respondessem positivamente à terapia empregada, tais resultados ficariam encobertos pelos não respondedores durante a análise dos dados. O desenvolvimento de potenciais biomarcadores de desregulação imune e sua correlação com a variabilidade fenotípica permitiriam a pré-seleção de pacientes com maior potencial de ganhos com intervenções imunomoduladoras (AHMAD *et al.*, 2017; FREGEAC; COLLEAUX; NGUYEN, 2016; HU; EHLI; BOOMSMA, 2017; INGA JÁCOME *et al.*, 2016; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014). Portanto, marcadores inflamatórios, incluindo alvos de microRNA, tem potencial para o desenvolvimento de tratamentos individualizados no futuro. (SINGH, 2009) (Figure 1).

Apesar das discrepâncias nos resultados e limitações metodológicas encontradas nos estudos citados nesta revisão, a existência de um subgrupo de pacientes com TEA que respondem ao tratamento imunológico não pode ser excluída. Estudos para investigar essa possibilidade devem ser realizados, e a eficácia de terapias previamente testadas em humanos ou modelos animais deve ser avaliada. Drogas com potencial anti-inflamatório, como donepezila, resveratrol e fingolimode demonstraram resultados positivos em modelos animais de TEA (BAKHEET *et al.*, 2016, 2017; BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2014; BHANDARI; KUHAD, 2017; HIRSCH *et al.*, 2018; KARVAT; KIMCHI, 2014; KIM *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2017), sugerindo potencial terapêutico promissor e incentivando que pesquisas adicionais sejam realizadas.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de terapias eficazes para o TEA é urgente. Apesar da disfunção imunológica ser uma via potencial para intervenção medicamentosa num subgrupo de indivíduos com TEA, poucos estudos visando uma ação imunomoduladora foram realizados. A maioria desses estudos não é controlada por placebo e usa metodologias diferentes, tornando a interpretação dos resultados um desafio. O uso de potenciais biomarcadores como ferramentas de triagem pode permitir a seleção de

indivíduos específicos para ensaios clínicos e, no futuro, determinar quais pacientes poderiam se beneficiar de determinadas terapias. Estudos com maior número de participantes, randomizados e controlados com placebo, seja com intervenções já descritas em humanos ou com novas terapias de estudos translacionais em modelos animais, são necessários.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina (UFRGS) e ao Grupo de Pesquisa Translacional em Desordem do Espectro Autista (GETTEA-UFRGS) pela oportunidade de trabalhar no projeto.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. F. *et al.* Imbalance between the anti- and pro-inflammatory milieu in blood leukocytes of autistic children. **Molecular Immunology**, v. 82, p. 57–65, 2017.
- AKHONDZADEH, S. *et al.* Double-blind placebo-controlled trial of pentoxifylline added to risperidone: effects on aberrant behavior in children with autism. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 1, p. 32–36, 2010.
- AL-AYADHI, L. Y. Pro-inflammatory cytokines in autistic children in central Saudi Arabia. **Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)**, v. 10, n. 2, p. 155–158, 2005.
- AL-AYADHI, L. Y. *et al.* Behavioral Benefits of Camel Milk in Subjects with Autism Spectrum Disorder. **Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP**, v. 25, n. 11, p. 819–823, 2015.
- AL-AYADHI, L. Y.; MOSTAFA, G. A. Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 158, 2012.
- AL-AYADHI, L. Y.; MOSTAFA, G. A. Elevated serum levels of macrophage-derived chemokine and thymus and activation-regulated chemokine in autistic children. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 846, 2013.
- ALCAMÍ PERTEJO, M.; PERAL GUERRA, M.; GILABERTE, I. Open study of fluoxetine in children with autism. **Actas Espanolas De Psiquiatria**, v. 28, n. 6, p. 353–356, 2000.
- ALLAM-NDOUL, B. *et al.* Effect of n-3 fatty acids on the expression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, p. 69, 2016.
- ARIAS-NEGRETE, S.; KELLER, K.; CHADEE, K. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 208, n. 2, p. 582–589, 1995.
- ARNAUDOV, A.; KOSTOVA, Z. Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy.

Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 29, n. 6, p. 1017–1023, 2015.

ASADABADI, M. *et al.* Celecoxib as adjunctive treatment to risperidone in children with autistic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Psychopharmacology**, v. 225, n. 1, p. 51–59, 2013.

ASHWOOD, P. *et al.* Decreased transforming growth factor beta1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 204, n. 1–2, p. 149–153, 2008.

ASHWOOD, P. *et al.* Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, n. 1–2, p. 196–199, 2011a.

ASHWOOD, P. *et al.* Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. **Brain, behavior, and immunity**, v. 25, n. 1, p. 40–5, jan. 2011b.

ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)**. [s.l.] American Psychiatric Pub, 2013.

ATKURI, K. R. *et al.* N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 355–359, 2007.

BAIO, J. *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 67, n. 6, p. 1–23, 27 abr. 2018.

BAKHEET, S. A. *et al.* Resveratrol treatment attenuates chemokine receptor expression in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 77, p. 1–10, 2016.

BAKHEET, S. A. *et al.* Resveratrol Ameliorates Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T Regulatory Cell-Related Transcription Factor Signaling in a BTBR T + tf/J Mouse Model of Autism. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5201–5212, 2017.

BAMBINI-JUNIOR, V. *et al.* Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, v. 583, p. 176–181, 2014.

BANSAL, H. *et al.* A Short Study Report on Bone Marrow Aspirate Concentrate Cell Therapy in Ten South Asian Indian Patients with Autism. **Journal of Stem Cells**, v. 11, n. 1, p. 25–36, 2016.

BARRETT, R. P.; FEINSTEIN, C.; HOLE, W. T. Effects of naloxone and naltrexone on self-injury: a double-blind, placebo-controlled analysis. **American journal of mental retardation: AJMR**, v. 93, n. 6, p. 644–651, 1989.

BASHIR, S.; AL-AYADHI, L. Y. Effect of camel milk on thymus and activation-regulated chemokine in autistic children: double-blind study. **Pediatric Research**, v. 75, n. 4, p. 559–563, 2014.

BAUMEISTER, D.; CIUFOLINI, S.; MONDELLI, V. Effects of psychotropic drugs on inflammation: consequence or mediator of therapeutic effects in psychiatric treatment? **Psychopharmacology**, v. 233, n. 9, p. 1575–1589, 2016.

BAXTER, A. J. *et al.* The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. **Psychological Medicine**, v. 45, n. 3, p. 601–613, 2015.

BENDTZEN, K.; HANSEN, P. R.; RIENECK, K. Spironolactone inhibits production of proinflammatory cytokines, including tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma, and has potential in the treatment of arthritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 134, n. 1, p. 151–158, 2003.

- BENVENUTO, A. *et al.* Pharmacotherapy of autism spectrum disorders. **Brain and Development**, v. 35, n. 2, p. 119–127, 2013.
- BERTOLINO, B. *et al.* Beneficial Effects of Co-Ultramicronized Palmitoylethanolamide/Luteolin in a Mouse Model of Autism and in a Case Report of Autism. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 23, n. 1, p. 87–98, 2017.
- BHANDARI, R.; KUHAD, A. Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. **Neurochemistry International**, v. 103, p. 8–23, 2017.
- BORIS, M. *et al.* Effect of pioglitazone treatment on behavioral symptoms in autistic children. **Journal of Neuroinflammation**, v. 4, n. 1, p. 3, 5 jan. 2007.
- BOUVARD, M. P. *et al.* Low-dose naltrexone effects on plasma chemistries and clinical symptoms in autism: a double-blind, placebo-controlled study. **Psychiatry Research**, v. 58, n. 3, p. 191–201, 1995.
- BRADSTREET, J. J. *et al.* Spironolactone might be a desirable immunologic and hormonal intervention in autism spectrum disorders. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 5, p. 979–987, 2007.
- BRADSTREET, J. J. *et al.* Efficacy of fetal stem cell transplantation in autism spectrum disorders: an open-labeled pilot study. **Cell Transplantation**, v. 23 Suppl 1, p. S105-112, 2014.
- BRAUNSCHWEIG, D. *et al.* Behavioral Correlates of Maternal Antibody Status Among Children with Autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 42, n. 7, p. 1435–1445, 2012.
- BRENTANI, H. *et al.* Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. suppl 1, p. S62–S72, 2013.
- BUESCHER, A. V. S. *et al.* Costs of Autism Spectrum Disorders in the United Kingdom and the United States. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 721, 1 ago. 2014.
- BUITELAAR, J. K. *et al.* Behavioral effects of Org 2766, a synthetic analog of the adrenocorticotrophic hormone (4-9), in 14 outpatient autistic children. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 20, n. 4, p. 467–478, 1990.
- BUITELAAR, J. K. *et al.* The adrenocorticotrophic hormone (4-9) analog ORG 2766 benefits autistic children: report on a second controlled clinical trial. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 31, n. 6, p. 1149–1156, 1992a.
- BUITELAAR, J. K. *et al.* The use of adrenocorticotrophic hormone (4-9) analog ORG 2766 in autistic children: effects on the organization of behavior. **Biological Psychiatry**, v. 31, n. 11, p. 1119–1129, 1992b.
- BUITELAAR, J. K. *et al.* A controlled trial with ORG 2766, an ACTH-(4-9) analog, in 50 relatively able children with autism. **European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 6, n. 1, p. 13–19, 1996.
- CAMPBELL, M. *et al.* Naltrexone in autistic children: a double-blind and placebo-controlled study. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 130–135, 1990.
- CAMPBELL, M. *et al.* Naltrexone in autistic children: behavioral symptoms and attentional learning. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1283–1291, 1993.
- CANNELL, J. J. Autism, will vitamin D treat core symptoms? **Medical Hypotheses**, v. 81, n. 2, p. 195–198, 2013.
- CAREAGA, M. *et al.* Immune Endophenotypes in Children With Autism Spectrum Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 5, p. 434–441, 2017.

CAREAGA, M.; VAN DE WATER, J.; ASHWOOD, P. Immune dysfunction in autism: a pathway to treatment. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 7, n. 3, p. 283–292, 2010.

CHANTILUKE, K. *et al.* Disorder-dissociated effects of fluoxetine on brain function of working memory in attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. **Psychological Medicine**, v. 45, n. 6, p. 1195–1205, 2015.

CHENG, Y.-S. *et al.* Supplementation of omega 3 fatty acids may improve hyperactivity, lethargy, and stereotypy in children with autism spectrum disorders: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 13, p. 2531–2543, 2017.

CHEZ, M. *et al.* Safety and observations in a pilot study of lenalidomide for treatment in autism. **Autism Research and Treatment**, v. 2012, p. 291601, 2012.

CHEZ, M. G. *et al.* Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. **Journal of Child Neurology**, v. 17, n. 11, p. 833–837, 2002.

CHEZ, M. G. *et al.* Memantine as adjunctive therapy in children diagnosed with autistic spectrum disorders: an observation of initial clinical response and maintenance tolerability. **Journal of Child Neurology**, v. 22, n. 5, p. 574–579, 2007.

CHEZ, M. G.; GUIDO-ESTRADA, N. Immune therapy in autism: historical experience and future directions with immunomodulatory therapy. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 7, n. 3, p. 293–301, 2010.

CHOI, J. E. *et al.* Change in plasma cytokine levels during risperidone treatment in children with autism. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 24, n. 10, p. 586–589, 2014.

CHUGANI, D. C. *et al.* Efficacy of Low-Dose Buspirone for Restricted and Repetitive Behavior in Young Children with Autism Spectrum Disorder: A Randomized Trial. **The Journal of Pediatrics**, v. 170, p. 45- 53.e1–4, 2016.

DAWSON, G. *et al.* Autologous Cord Blood Infusions Are Safe and Feasible in Young Children with Autism Spectrum Disorder: Results of a Single-Center Phase I Open-Label Trial. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 6, n. 5, p. 1332–1339, 2017.

DEAN, O. M. *et al.* A randomised, double blind, placebo-controlled trial of a fixed dose of N-acetyl cysteine in children with autistic disorder. **The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 51, n. 3, p. 241–249, 2017.

DEEPMALA, NULL *et al.* Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 294–321, 2015.

DELGIUDICE-ASCH, G. *et al.* Brief report: a pilot open clinical trial of intravenous immunoglobulin in childhood autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 29, n. 2, p. 157–160, 1999.

DEROSA, G.; SAHEBKAR, A.; MAFFIOLI, P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 1, p. 153–161, 2018.

DOENYAS, C. Gut Microbiota, Inflammation, and Probiotics on Neural Development in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience**, v. 374, p. 271–286, 2018.

DOLATABADI, H. R. D. *et al.* The Effects of Pentoxifylline on Serum Levels of Interleukin 10 and Interferon Gamma and Memory Function in Lipopolysaccharide-induced Inflammation in Rats. **Advanced Biomedical Research**, v. 6, p. 110, 2017.

- DUFFY, F. H. *et al.* Corticosteroid therapy in regressive autism: a retrospective study of effects on the Frequency Modulated Auditory Evoked Response (FMAER), language, and behavior. **BMC neurology**, v. 14, p. 70, 2014.
- EL-ANSARY, A. *et al.* Identification of Biomarkers of Impaired Sensory Profiles among Autistic Patients. **PloS One**, v. 11, n. 11, p. e0164153, 2016.
- EL GOHARY, T. M. *et al.* Plasma level of transforming growth factor β 1 in children with autism spectrum disorder. **Egyptian Journal of Ear, Nose, Throat and Allied Sciences**, v. 16, n. 1, p. 69–73, 2015.
- ENSTROM, A. *et al.* Detection of IL-17 and IL-23 in Plasma Samples of Children with Autism. **American Journal of Biochemistry & Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 114–120, 2008.
- ERNST, E. The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: Ginkgo, St. John's Wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. **Annals of Internal Medicine**, v. 136, n. 1, p. 42–53, 2002.
- ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 469–486, 2015.
- FARJADIAN, S. *et al.* Effects of omega-3 fatty acids on serum levels of T-helper cytokines in children with asthma. **Cytokine**, v. 85, p. 61–66, 2016.
- FATEMI, S. H. *et al.* Fluoxetine in treatment of adolescent patients with autism: a longitudinal open trial. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 28, n. 4, p. 303–307, 1998.
- FELDMAN, H. M.; KOLMEN, B. K.; GONZAGA, A. M. Naltrexone and communication skills in young children with autism. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 38, n. 5, p. 587–593, 1999.
- FENG, J. *et al.* Clinical improvement following vitamin D3 supplementation in Autism Spectrum Disorder. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 284–290, 2017.
- FERGUSON, B. J. *et al.* Associations between cytokines, endocrine stress response, and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 58, p. 57–62, 2016.
- FLEISHER-BERKOVICH, S. *et al.* Inhibitory effect of carnosine and N-acetyl carnosine on LPS-induced microglial oxidative stress and inflammation. **Peptides**, v. 30, n. 7, p. 1306–1312, 2009.
- FREGÉAC, J.; COLLEAUX, L.; NGUYEN, L. S. The emerging roles of MicroRNAs in autism spectrum disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 71, p. 729–738, 2016.
- FUDENBERG, H. H. Dialysable lymphocyte extract (DLyE) in infantile onset autism: a pilot study. **Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)**, v. 9, n. 1–3, p. 143–147, 1996.
- FUNG, L. K. *et al.* Brief report: an open-label study of the neurosteroid pregnenolone in adults with autism spectrum disorder. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 44, n. 11, p. 2971–2977, 2014.
- GHALEIHA, A. *et al.* A pilot double-blind placebo-controlled trial of pioglitazone as adjunctive treatment to risperidone: Effects on aberrant behavior in children with autism. **Psychiatry Research**, v. 229, n. 1–2, p. 181–187, 2015.
- GHALEIHA, A. *et al.* Minocycline as Adjunctive Treatment to Risperidone in Children with Autistic Disorder: A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Trial. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 26, n. 9, p. 784–791, 2016.
- GHANIZADEH, A.; AYOOBZADEHSHIRAZI, A. A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial of adjuvant buspirone for irritability in autism. **Pediatric Neurology**, v.

52, n. 1, p. 77–81, 2015.

GHANIZADEH, A.; DERAKHSHAN, N. N-acetylcysteine for treatment of autism, a case report. **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 17, n. 10, p. 985–987, 2012.

GHANIZADEH, A.; MOGHIMI-SARANI, E. A randomized double blind placebo controlled clinical trial of N-Acetylcysteine added to risperidone for treating autistic disorders. **BMC psychiatry**, v. 13, p. 196, 2013.

GLADYSZ, D.; KRZYWDZIŃSKA, A.; HOZYASZ, K. K. Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder-Could They Hold Promise for Causative Treatment? **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6387–6435, 2018.

GOINES, P. *et al.* Autoantibodies to cerebellum in children with autism associate with behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 514–523, 2011.

GONZALEZ, N. M. *et al.* Naltrexone plasma levels, clinical response and effect on weight in autistic children. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 203–208, 1994.

GOTTFRIED, C. *et al.* The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, p. 121, 2015.

GUPTA, S. Immunological treatments for autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 30, n. 5, p. 475–479, 2000.

GUPTA, S.; RIMLAND, B.; SHILLING, P. D. Pentoxifylline: brief review and rationale for its possible use in the treatment of autism. **Journal of Child Neurology**, v. 11, n. 6, p. 501–504, 1996.

HAJIZADEH-ZAKER, R. *et al.* l-Carnosine As an Adjunctive Therapy to Risperidone in Children with Autistic Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 74–81, 2018.

HAN, Y. M. Y. *et al.* Distinct Cytokine and Chemokine Profiles in Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.

HANDEN, B. L. *et al.* A double-blind, placebo-controlled trial of oral human immunoglobulin for gastrointestinal dysfunction in children with autistic disorder. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 39, n. 5, p. 796–805, 2009.

HARDAN, A. Y. *et al.* A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 956–961, 2012.

HASANZADEH, E. *et al.* A double-blind placebo controlled trial of Ginkgo biloba added to risperidone in patients with autistic disorders. **Child Psychiatry and Human Development**, v. 43, n. 5, p. 674–682, 2012.

HELLINGS, J. A. *et al.* Sertraline response in adults with mental retardation and autistic disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 57, n. 8, p. 333–336, 1996.

HEUER, L. *et al.* Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 1, n. 5, p. 275–283, 2008.

HIRSCH, M. M. *et al.* Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 336–343, maio 2018.

HOLLANDER, E. *et al.* B Lymphocyte Antigen D8/17 and Repetitive Behaviors in Autism. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 2, p. 317–320, 1999.

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

HOLLANDER, E. *et al.* A double-blind placebo-controlled trial of fluoxetine for repetitive behaviors and global severity in adult autism spectrum disorders. **The American Journal of Psychiatry**, v. 169, n. 3, p. 292–299, 2012.

HORVATH, A.; ŁUKASIK, J.; SZAJEWSKA, H. ω -3 Fatty Acid Supplementation Does Not Affect Autism Spectrum Disorder in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The Journal of Nutrition**, v. 147, n. 3, p. 367–376, 2017.

HU, Y.; EHLI, E. A.; BOOMSMA, D. I. MicroRNAs as biomarkers for psychiatric disorders with a focus on autism spectrum disorder: Current progress in genetic association studies, expression profiling, and translational research. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 10, n. 7, p. 1184–1203, 2017.

INGA JÁCOME, M. C. *et al.* Peripheral Inflammatory Markers Contributing to Comorbidities in Autism. **Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 4, 2016.

JASION, V. S.; BURNETT, B. P. Survival and digestibility of orally-administered immunoglobulin preparations containing IgG through the gastrointestinal tract in humans. **Nutrition Journal**, v. 14, p. 22, 2015.

JIA, F. *et al.* Core symptoms of autism improved after vitamin D supplementation. **Pediatrics**, v. 135, n. 1, p. e196-198, 2015.

JOSHI, G. *et al.* A Prospective Open-Label Trial of Memantine Hydrochloride for the Treatment of Social Deficits in Intellectually Capable Adults With Autism Spectrum Disorder. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 262–271, 2016.

JUGE, N.; MITHEN, R. F.; TRAKA, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 64, n. 9, p. 1105–1127, 2007.

JYONOUCHI, H. *et al.* Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. **Neuropsychobiology**, v. 51, n. 2, p. 77–85, 2005.

JYONOUCHI, H.; GENG, L.; DAVIDOW, A. L. Cytokine profiles by peripheral blood monocytes are associated with changes in behavioral symptoms following immune insults in a subset of ASD subjects: an inflammatory subtype? **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 187, 2014.

KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA, J.; BŁASZCZYK, S. The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 28, n. 2, p. 124–126, 2012.

KANG, D.-W. *et al.* Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 10, 2017.

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

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

KARVAT, G.; KIMCHI, T. Acetylcholine Elevation Relieves Cognitive Rigidity and Social

- Deficiency in a Mouse Model of Autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 4, p. 831–840, 2014.
- KATO, Y. *et al.* Spironolactone inhibits production of proinflammatory mediators in response to lipopolysaccharide via inactivation of nuclear factor- κ B. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 36, n. 3, p. 237–241, 2014.
- KEMPURAJ, D. *et al.* Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 7, p. 934–944, 2005.
- KERLEY, C. P. *et al.* Lack of effect of vitamin D3 supplementation in autism: a 20-week, placebo-controlled RCT. **Archives of Disease in Childhood**, v. 102, n. 11, p. 1030–1036, 2017.
- KIM, H.-S.; SUH, Y.-H. Minocycline and neurodegenerative diseases. **Behavioural Brain Research**, v. 196, n. 2, p. 168–179, 2009.
- KIM, J.-W. *et al.* Subchronic Treatment of Donepezil Rescues Impaired Social, Hyperactive, and Stereotypic Behavior in Valproic Acid-Induced Animal Model of Autism. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104927, 2014.
- KING, B. H. *et al.* Double-blind, placebo-controlled study of amantadine hydrochloride in the treatment of children with autistic disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 40, n. 6, p. 658–665, 2001.
- KING, B. H. *et al.* Lack of efficacy of citalopram in children with autism spectrum disorders and high levels of repetitive behavior: citalopram ineffective in children with autism. **Archives of General Psychiatry**, v. 66, n. 6, p. 583–590, 2009.
- KNABE, R.; SCHULZ, P.; RICHARD, J. Initial aggravation of self-injurious behavior in autistic patients receiving naltrexone treatment. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 20, n. 4, p. 591–593, 1990.
- KOČOVSKÁ, E. *et al.* Vitamin d in the general population of young adults with autism in the faroe islands. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 44, n. 12, p. 2996–3005, 2014.
- KOLMEN, B. K. *et al.* Naltrexone in young autistic children: a double-blind, placebo-controlled crossover study. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 34, n. 2, p. 223–231, 1995.
- KOLMEN, B. K. *et al.* Naltrexone in young autistic children: replication study and learning measures. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 36, n. 11, p. 1570–1578, 1997.
- KRETH, S. *et al.* Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 34, n. 1, p. 10–16, 2010.
- LACIVITA, E. *et al.* Targets for Drug Therapy for Autism Spectrum Disorder: Challenges and Future Directions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 9114–9141, 2017.
- LAYÉ, S. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 1, p. 12–38, 2018.
- LEBOYER, M. *et al.* Brief report: a double-blind study of naltrexone in infantile autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 22, n. 2, p. 309–319, 1992.
- LECLERC, S.; EASLEY, D. Pharmacological therapies for autism spectrum disorder: a review. **P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management**, v. 40, n. 6, p. 389–397, 2015.

- LEIGH, M. J. S. *et al.* A randomized double-blind, placebo-controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. **Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP**, v. 34, n. 3, p. 147–155, 2013.
- LENG, Y.; CHUANG, D.-M. Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 28, p. 7502–7512, 2006.
- LI, Q.; ZHOU, J.-M. The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. **Neuroscience**, v. 324, p. 131–139, 2016.
- LI, Y.-J.; LI, Y.-M.; XIANG, D.-X. Supplement intervention associated with nutritional deficiencies in autism spectrum disorders: a systematic review. **European Journal of Nutrition**, 2017.
- LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 31–59, 2009.
- LV, Y.-T. *et al.* Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, p. 196, 2013.
- LYNCH, R. *et al.* Sulforaphane from Broccoli Reduces Symptoms of Autism: A Follow-up Case Series from a Randomized Double-blind Study. **Global Advances in Health and Medicine**, v. 6, p. 2164957X17735826, 2017.
- MACDOWELL, K. S. *et al.* Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 121–135, 2013.
- MACLENNAN, K. M.; DARLINGTON, C. L.; SMITH, P. F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 3, p. 235–257, 2002.
- MADORE, C. *et al.* Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3, and Microbiota. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 3597209, 2016.
- MAKINODAN, M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with early childhood social interaction in autism spectrum disorder. **Neurochemistry International**, v. 104, p. 1–5, 2017.
- MARCHEZAN, J. *et al.* A Placebo-Controlled Crossover Trial of Gastrin-Releasing Peptide in Childhood Autism. **Clinical Neuropharmacology**, v. 40, n. 3, p. 108–112, 2017.
- MARCUS, R. N. *et al.* A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescents with irritability associated with autistic disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 48, n. 11, p. 1110–1119, 2009.
- MARLER, S.; SANDERS, K. B.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. N-acetylcysteine as treatment for self-injurious behavior in a child with autism. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 231–234, 2014.
- MARX, C. E. *et al.* Proof-of-concept trial with the neurosteroid pregnenolone targeting cognitive and negative symptoms in schizophrenia. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 8, p. 1885–1903, 2009.
- MASI, A. *et al.* Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 440–446, 2015.
- MASI, A. *et al.* The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 194–204, 2017.

- MAZAHERY, H. *et al.* Relationship between Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control and Randomised Controlled Trials. **Nutrients**, v. 9, n. 2, 2017.
- MCCORMICK, L. H. Treatment with buspirone in a patient with autism. **Archives of Family Medicine**, v. 6, n. 4, p. 368–370, 1997.
- MCCRACKEN, J. T. *et al.* Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 314–321, 2002.
- MCDOUGLE, C. J. *et al.* Sertraline in adults with pervasive developmental disorders: a prospective open-label investigation. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 62–66, 1998.
- MCDOUGLE, C. J. *et al.* Toward an immune-mediated subtype of autism spectrum disorder. **Brain Research**, v. 1617, p. 72–92, 2015.
- MEAD, J.; ASHWOOD, P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 49–55, 2015.
- MEGUID, N. A. *et al.* Reduced serum levels of 25-hydroxy and 1,25-dihydroxy vitamin D in Egyptian children with autism. **Journal of Alternative and Complementary Medicine (New York, N.Y.)**, v. 16, n. 6, p. 641–645, 2010.
- MEHRAZAD-SABER, Z.; KHEIROURI, S.; NOORAZAR, S.-G. Effects of L- Carnosine Supplementation on Sleep Disorders and Disease Severity in Autistic Children: A Randomized, Controlled Clinical Trial. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2018.
- MELAMED, I. R. *et al.* A pilot study of high-dose intravenous immunoglobulin 5% for autism: Impact on autism spectrum and markers of neuroinflammation. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, 2018.
- MELTZER, A.; VAN DE WATER, J. The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 284–298, 2017.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673–751, 2000.
- MINSHAWI, N. F. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of D-cycloserine for the enhancement of social skills training in autism spectrum disorders. **Molecular Autism**, v. 7, p. 2, 2016.
- MIURA, R. *et al.* Anti-inflammatory effect of spironolactone on human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 101, n. 3, p. 256–259, 2006a.
- MIURA, R. *et al.* Aldosterone synthesis and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 102, n. 3, p. 288–295, 2006b.
- MORDEKAR, S. R. *et al.* Corticosteroid treatment of behaviour, language and motor regression in childhood disintegrative disorder. **European journal of paediatric neurology: EJPN**, v. 13, n. 4, p. 367–369, 2009.
- MOSTAFA, G. A.; AL-AYADHI, L. Y. Increased serum levels of anti-ganglioside M1 auto-antibodies in autistic children: relation to the disease severity. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 39, 2011.
- MOSTAFA, G. A.; AL-AYADHI, L. Y. The relationship between the increased frequency of serum antineuronal antibodies and the severity of autism in children. **European journal of paediatric neurology: EJPN**, v. 16, n. 5, p. 464–468, 2012a.

- MOSTAFA, G. A.; AL-AYADHI, L. Y. Reduced serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D in children with autism: Relation to autoimmunity. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 201, 2012b.
- NAKANE A. Effect of pentoxifylline in autistic children. **Tokyo Eisei Gakkashi**, n. 65, p. 104–105, 1980.
- NAPOLIONI, V. *et al.* Plasma cytokine profiling in sibling pairs discordant for autism spectrum disorder. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, p. 38, 2013.
- NIEDERHOFER, H. First preliminary results of an observation of Ginkgo Biloba treating patients with autistic disorder. **Phytotherapy research: PTR**, v. 23, n. 11, p. 1645–1646, 2009.
- NIEDERHOFER, H.; STAFFEN, W.; MAIR, A. Immunoglobulins as an alternative strategy of psychopharmacological treatment of children with autistic disorder. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 1014–1015, 2003.
- NIERENBERG, A. A. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Alpha as a Novel Target for Bipolar Disorder and Other Neuropsychiatric Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 9, p. 761-769, 2018.
- NIKOO, M. *et al.* N-acetylcysteine as an adjunctive therapy to risperidone for treatment of irritability in autism: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of efficacy and safety. **Clinical Neuropharmacology**, v. 38, n. 1, p. 11–17, 2015.
- NORIEGA, D. B.; SAVELKOUL, H. F. J. Immune dysregulation in autism spectrum disorder. **European Journal of Pediatrics**, v. 173, n. 1, p. 33–43, 2014.
- NOTO, C. *et al.* Effects of Risperidone on Cytokine Profile in Drug-Naïve First-Episode Psychosis. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 4, 2015.
- ORSUCCI, D. *et al.* Neuroprotective effects of tetracyclines: molecular targets, animal models and human disease. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 8, n. 3, p. 222–231, 2009.
- OWEN, R. *et al.* Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescents with autistic disorder. **Pediatrics**, v. 124, n. 6, p. 1533–1540, 2009.
- OWLEY, T. *et al.* An open-label trial of escitalopram in pervasive developmental disorders. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 44, n. 4, p. 343–348, 2005.
- OWLEY, T. *et al.* A prospective, open-label trial of memantine in the treatment of cognitive, behavioral, and memory dysfunction in pervasive developmental disorders. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 16, n. 5, p. 517–524, 2006.
- OWLEY, T. *et al.* A pharmacogenetic study of escitalopram in autism spectrum disorders. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2010.
- PALACIO, J. R.; MARKERT, U. R.; MARTÍNEZ, P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. **Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 60, n. 7, p. 695–704, 2011.
- PARDO, C. A. *et al.* A pilot open-label trial of minocycline in patients with autism and regressive features. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 5, n. 1, p. 9, 2013.
- PARIBELLO, C. *et al.* Open-label add-on treatment trial of minocycline in fragile X syndrome. **BMC neurology**, v. 10, p. 91, 2010.
- PÄRTTY, A. *et al.* A possible link between early probiotic intervention and the risk of

- neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. **Pediatric Research**, v. 77, n. 6, p. 823–828, 2015.
- PÉREZ, J. C. J. *et al.* Spironolactone Effect in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Wistar Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 3196431, 2016.
- PINAR KARAPINAR, S. *et al.* The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. **Archives of Oral Biology**, v. 68, p. 48–54, 2016.
- PIRAS, I. S. *et al.* Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 38, p. 91–99, 2014.
- PLIOPLYS, A. V. Intravenous immunoglobulin treatment of children with autism. **Journal of Child Neurology**, v. 13, n. 2, p. 79–82, 1998.
- POSAR, A.; VISCONTI, P. Omega-3 supplementation in autism spectrum disorders: A still open question? **Journal of Pediatric Neurosciences**, v. 11, n. 3, p. 225–227, 2016a.
- POSAR, A.; VISCONTI, P. Complementary and Alternative Medicine in Autism: The Question of Omega-3. **Pediatric Annals**, v. 45, n. 3, p. e103-107, 2016b.
- POSEY, D. J. *et al.* A pilot study of D-cycloserine in subjects with autistic disorder. **The American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 11, p. 2115–2117, 2004.
- PROKOPIEVA, V. D. *et al.* Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- PULTE, E. D. *et al.* FDA Approval Summary: Lenalidomide as Maintenance Therapy After Autologous Stem Cell Transplant in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. **The Oncologist**, v. 23, n. 6, p. 734–739, 2018.
- RICCI, S. *et al.* Altered Cytokine and BDNF Levels in Autism Spectrum Disorder. **Neurotoxicity Research**, v. 24, n. 4, p. 491–501, 2013.
- ROGLIANI, P. *et al.* Pleiotropic effects of hypoglycemic agents: implications in asthma and COPD. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 40, p. 34–38, 2018.
- ROSE, D.; VAN DE WATER, J.; ASHWOOD, P. Unique immune profiles in children with autism who experience gastrointestinal co-morbidity. **Brain, Behavior, and Immunity**, PsychoNeuroImmunology Research Society's 23rd Annual Scientific Meeting. v. 57, p. e23–e24, 2016.
- ROSENBLAT, J. D.; MCINTYRE, R. S. Efficacy and tolerability of minocycline for depression: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Journal of Affective Disorders**, v. 227, p. 219–225, 2018.
- ROSSIGNOL, D. A. Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: a systematic review. **Annals of Clinical Psychiatry: Official Journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists**, v. 21, n. 4, p. 213–236, 2009.
- RÜTTER, A.; LUGER, T. A. High-dose intravenous immunoglobulins: an approach to treat severe immune-mediated and autoimmune diseases of the skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 6, p. 1010–1024, 2001.
- SAAD, K. *et al.* Vitamin D status in autism spectrum disorders and the efficacy of vitamin D supplementation in autistic children. **Nutritional Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 346–351, 2016.
- SAAD, K. *et al.* Randomized controlled trial of vitamin D supplementation in children with autism spectrum disorder. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied**

Disciplines, v. 59, n. 1, p. 20–29, 2018.

SALLAM, M. *et al.* Anti-inflammatory effect of Omega-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma; relation to nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and inflammatory cytokines il-12 and il-13. **Egyptian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, 2010.

SANDLER, R. H. *et al.* Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. **Journal of Child Neurology**, v. 15, n. 7, p. 429–435, 2000.

SAREDDY, G. R. *et al.* The nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib suppresses the growth and induces apoptosis of human glioblastoma cells via the NF- κ B pathway. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 106, n. 1, p. 99–109, 2012.

SATHE, N. *et al.* Nutritional and Dietary Interventions for Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. **Pediatrics**, v. 139, n. 6, p. e20170346, 2017.

SCHNEIDER, C. K. *et al.* Oral human immunoglobulin for children with autism and gastrointestinal dysfunction: a prospective, open-label study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 36, n. 8, p. 1053–1064, 2006.

SCHWEINGRUBER, N. *et al.* Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 1, p. 174–182, 2012.

SCIFO, R. *et al.* Opioid-immune interactions in autism: behavioural and immunological assessment during a double-blind treatment with naltrexone. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**, v. 32, n. 3, p. 351–359, 1996.

SEKI, Y. *et al.* Pretreatment of aripiprazole and minocycline, but not haloperidol, suppresses oligodendrocyte damage from interferon- γ -stimulated microglia in co-culture model. **Schizophrenia Research**, v. 151, n. 1, p. 20–28, 2013.

SHARMA, A. *et al.* An Improved Case of Autism as Revealed by PET CT Scan in Patient Transplanted with Autologous Bone Marrow Derived Mononuclear Cells. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n. 2, 2013a.

SHARMA, A. *et al.* Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for autism: an open label proof of concept study. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 623875, 2013b.

SHENOY, S.; ARNOLD, S.; CHATILA, T. Response to steroid therapy in autism secondary to autoimmune lymphoproliferative syndrome. **The Journal of Pediatrics**, v. 136, n. 5, p. 682–687, 2000.

SHIMOIDE M. Effect of pentoxifylline (Trental) on infantile autism. **Clin Exp Med**, n. 58, p. 285–288, 1981.

SHROFF, G. Human Embryonic Stem Cells in the Treatment of Autism: A Case Series. **Innovations in Clinical Neuroscience**, v. 14, n. 3–4, p. 12–16, 2017.

SINGH, K. *et al.* Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 43, p. 15550–15555, 2014.

SINGH, V. K. Phenotypic expression of autoimmune autistic disorder (AAD): a major subset of autism. **Annals of Clinical Psychiatry: Official Journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists**, v. 21, n. 3, p. 148–161, 2009.

SINISCALCO, D.; BRADSTREET, J. J.; ANTONUCCI, N. Therapeutic role of hematopoietic stem cells in autism spectrum disorder-related inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 140, 2013.

SMITH, L. E.; GREENBERG, J. S.; MAILICK, M. R. The family context of autism spectrum

disorders: influence on the behavioral phenotype and quality of life. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 143–155, 2014.

SOBÍŠ, J. *et al.* Therapeutic effect of aripiprazole in chronic schizophrenia is accompanied by anti-inflammatory activity. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 353–359, 2015.

SOCZYNSKA, J. K. *et al.* Novel therapeutic targets in depression: minocycline as a candidate treatment. **Behavioural Brain Research**, v. 235, n. 2, p. 302–317, 2012.

SOGAME S. Clinical experiences with the administration of pentoxifylline against autism and behavior abnormalities. **Jpn J Child Psych**, n. 19, p. 137–144, 1978.

SONG, R. *et al.* Valproic acid attenuates the expression of pro-inflammatory cytokines lipopolysaccharide-treated canine peripheral blood mononuclear cells (in vitro) and in a canine endotoxemia model (in vivo). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 166, n. 3–4, p. 132–137, 2015.

STEFANATOS, G. A.; GROVER, W.; GELLER, E. Case study: corticosteroid treatment of language regression in pervasive developmental disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 34, n. 8, p. 1107–1111, ago. 1995.

STEINGARD, R. J. *et al.* Sertraline treatment of transition-associated anxiety and agitation in children with autistic disorder. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 7, n. 1, p. 9–15, 1997.

STUBBS, E. G. Autistic children exhibit undetectable hemagglutination-inhibition antibody titers despite previous rubella vaccination. **Journal of Autism and Childhood Schizophrenia**, v. 6, n. 3, p. 269–274, 1976.

STUTZMAN, D.; DOPHEIDE, J. Acetylcysteine for treatment of autism spectrum disorder symptoms. **American journal of health-system pharmacy: AJHP**, v. 72, n. 22, p. 1956–1959, 2015.

STVOLINSKY, S. L. *et al.* Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 19, n. 1, p. 45–56, 1999.

SUDA, S. *et al.* Valproic acid attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat brain through inhibition of oxidative stress and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 707, n. 1–3, p. 26–31, 2013.

SUZUKI M; NAKASHITA Y; OGAWA T. Sugiyama A, *et al.*: On the effects of pentoxifylline upon the EEG activity of early infantile autism. **Brain Dev**, n. 6, p. 156, 1984.

TALIOU, A. *et al.* An open-label pilot study of a formulation containing the anti-inflammatory flavonoid luteolin and its effects on behavior in children with autism spectrum disorders. **Clinical Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 592–602, 2013.

TAROZZI, A. *et al.* Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 415078, 2013.

THEOHARIDES, T. C.; ASADI, S.; PANAGIOTIDOU, S. A case series of a luteolin formulation (NeuroProtek®) in children with autism spectrum disorders. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 317–323, 2012.

TOBIASOVA, Z. *et al.* Risperidone-related improvement of irritability in children with autism is not associated with changes in serum of epidermal growth factor and interleukin-13. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 21, n. 6, p. 555–564, 2011.

TOSTES, M. H. F. DE S. *et al.* Low serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) in children with autism. **Trends in Psychiatry and Psychotherapy**, v. 34, n. 3, p. 161–163, 2012.

- TSILIONI, I. *et al.* Children with autism spectrum disorders, who improved with a luteolin-containing dietary formulation, show reduced serum levels of TNF and IL-6. **Translational Psychiatry**, v. 5, p. e647, 2015.
- TUREK S. Treatment of psychotic and autistic children with pentoxifylline. **ASANA**, n. 1, p. 51–60., 1981.
- URBANO, M. *et al.* A trial of D-cycloserine to treat stereotypies in older adolescents and young adults with autism spectrum disorder. **Clinical Neuropharmacology**, v. 37, n. 3, p. 69–72, 2014.
- URBANO, M. *et al.* A trial of d-cycloserine to treat the social deficit in older adolescents and young adults with autism spectrum disorders. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 27, n. 2, p. 133–138, 2015.
- VERBATEN, M. N. *et al.* Effects of ORG-2766 on brain event-related potentials of autistic children. **Psychiatry Research**, v. 63, n. 1, p. 33–45, 1996.
- VERKHRATSKY, A.; RODRÍGUEZ, J. J.; PARPURA, V. Neuroglia in ageing and disease. **Cell and Tissue Research**, v. 357, n. 2, p. 493–503, 2014.
- WALTERS, A. S. *et al.* A case report of naltrexone treatment of self-injury and social withdrawal in autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 20, n. 2, p. 169–176, 1990.
- WANG, A. M. *et al.* Use of carnosine as a natural anti-senescence drug for human beings. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 65, n. 7, p. 869–871, 2000.
- WEISS, J. A. *et al.* The impact of child problem behaviors of children with ASD on parent mental health: the mediating role of acceptance and empowerment. **Autism: The International Journal of Research and Practice**, v. 16, n. 3, p. 261–274, 2012.
- WILLEMSSEN-SWINKELS, S. H. *et al.* Failure of naltrexone hydrochloride to reduce self-injurious and autistic behavior in mentally retarded adults. Double-blind placebo-controlled studies. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, n. 9, p. 766–773, 1995b.
- WILLEMSSEN-SWINKELS, S. H. *et al.* Placebo-controlled acute dosage naltrexone study in young autistic children. **Psychiatry Research**, v. 58, n. 3, p. 203–215, 1995a.
- WILLEMSSEN-SWINKELS, S. H. *et al.* Brief report: six months continuation treatment in naltrexone-responsive children with autism: an open-label case-control design. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 29, n. 2, p. 167–169, 1999.
- WILLEMSSEN-SWINKELS, S. H.; BUITELAAR, J. K.; VAN ENGELAND, H. The effects of chronic naltrexone treatment in young autistic children: a double-blind placebo-controlled crossover study. **Biological Psychiatry**, v. 39, n. 12, p. 1023–1031, 1996.
- WILLIAMS, P. G. *et al.* Brief report: case reports on naltrexone use in children with autism: controlled observations regarding benefits and practical issues of medication management. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 31, n. 1, p. 103–108, 2001.
- WINK, L. K. *et al.* A randomized placebo-controlled pilot study of N-acetylcysteine in youth with autism spectrum disorder. **Molecular Autism**, v. 7, p. 26, 2016.
- WU, H. *et al.* Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. **Life Sciences**, v. 173, p. 43–54, 2017.
- XIMENES, J. C. M. *et al.* Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 386, n. 7, p. 575–587, 2013.
- YANDRAPALLI, S.; ARONOW, W. S. Cardiovascular benefits of the newer medications for

treating type 2 diabetes mellitus. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, n. 7, p. 2124–2134, 2017.

YANG, C.-J. *et al.* The combined role of serotonin and interleukin-6 as biomarker for autism. **Neuroscience**, v. 284, p. 290–296, 2015.

YANG, Y.; TIAN, J.; YANG, B. Targeting gut microbiome: A novel and potential therapy for autism. **Life Sciences**, v. 194, p. 111–119, 2018.

YESSOUFOU, A.; WAHLI, W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. **Swiss Medical Weekly**, v. 140, p. w13071, 2010.

YONG, V. W. *et al.* The promise of minocycline in neurology. **The Lancet. Neurology**, v. 3, n. 12, p. 744–751, 2004.

ZHANG, R. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the increase in cytokines and chemotactic factors induced in vitro by lymph fluid from an intestinal ischemia-reperfusion injury model. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 31, n. 3, p. 508–514, 2015.

ZHAO, Y. *et al.* Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2004.

ZINGARELLI, G. *et al.* Clinical effects of naltrexone on autistic behavior. **American journal of mental retardation: AJMR**, v. 97, n. 1, p. 57–63, 1992.

Figura 1 - Endofenótipos imunológicos no autismo. A identificação de marcadores específicos relacionados a diferentes subgrupos de TEA pode ajudar a reduzir a heterogeneidade de participantes em ensaios clínicos. Além disso, ensaios com modelos animais permitem o estudo translacional de novas drogas, possíveis alvos e biomarcadores.

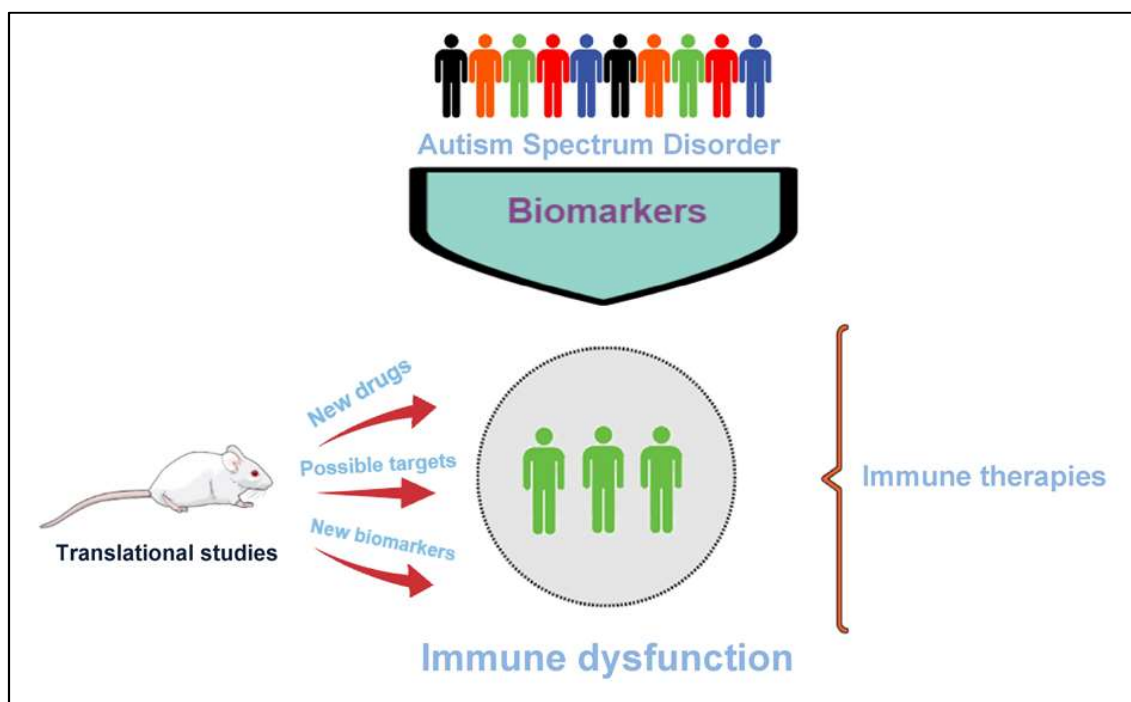


Tabela 1 – Resumo dos estudos com terapias imunomoduladoras no TEA

Terapia	Estudo	Dose	Período	n (TEA)	Instrumentos	Resultados	Ref.
Sulforafano	Ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo	50–150 μ mol	4-18 semanas	40	ABC, SRS, CGI-S, CGI-I	Redução nos escores ABC, SRS e CGI-I comparado ao placebo	(SINGH <i>et al.</i> , 2014)
Sulforafano	Série de casos	Não descrita	3 anos	16	Descritivo	Uma família relatou manutenção da melhora comportamental mesmo após suspensão do medicamento. Nove famílias continuaram o uso da medicação com manutenção dos ganhos	(LYNCH <i>et al.</i> , 2017)
Celecoxibe	Ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo	200-300 mg	10 semanas	40	ABC	Melhora nas subescalas irritabilidade, esquivia social e comportamento estereotipado	(ASADABA DI <i>et al.</i> , 2013)
Espironolactona	Relato de caso	2 mg/kg	4 semanas	1	ABC, PPVT-III	Melhora em todas as subescalas ABC. Ganhos na linguagem no PPVT-III	(BRADSTRE ET <i>et al.</i> , 2007)
Lenalidomida	Ensaio clínico aberto	2,5 mg	12 semanas	7	CARS, ADOS, ROWPVT, CGI-I	Redução de 57% no TNF- α sérico. Redução nos escores da CARS, melhora na CGI linguagem expressiva e receptiva com 6 semanas e somente expressiva com 12 semanas	(CHEZ <i>et al.</i> , 2012)
Pentoxifilina	Ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo	400-600 mg	10 semanas	40	ABC, ESRS	Melhora em todas as subescalas ABC	(AKHONDZ ADEH <i>et al.</i> , 2010)
Pentoxifilina	Ensaio clínico aberto	150-600 mg	Não descrita	23	Descritivo	“Muito efetivo” em 10 casos, “moderadamente efetivo” em 8 casos, “levemente efetivo” em 3 casos, e “não efetivo” em 2 casos	(SOGAME S, 1978)
Pentoxifilina	Ensaio clínico aberto	Não descrita	Não descrita	30	Descritivo	Seis pacientes (20%) com importante melhora comportamental e 14 (47%) leve melhora nos sintomas	(NAKANE A, 1980)

Terapia	Estudo	Dose	Período	n (TEA)	Instrumentos	Resultados	Ref.
Pentoxifilina	Ensaio clínico aberto	200 mg	3 meses	20	<i>Seiken's Critical List for Autistic Children</i> e avaliação dos pacientes em situações diversas	35% com melhora em pelo menos 2 critérios de avaliação	(SHIMOIDE M, 1981)
Pentoxifilina	Ensaio clínico aberto	200 mg	4 a 10 meses	2	Descritivo	Melhora na pronúncia de palavras e sílabas	(TUREK S, 1981)
Pentoxifilina	Ensaio clínico aberto	10-15 mg/kg	3 meses	20	EEG, "lista de sintomas para TEA", <i>Parent-Child Relationship Test</i>	EEG após tratamento com melhora em 39% dos casos. Melhora no "brincar com amigo" e "comunicação num teste psicológico"	(SUZUKI M; NAKASHITA Y; OGAWA T, 1984)
Luteolina	Série de casos	200 mg/10 kg	Não descrito	37	Descritivo	Melhora em características das fezes, "alergias", contato visual, aprendizagem, interação, atenção e fala	(THEOHARIDES; ASADI; PANAGIOTIDOU, 2012)
Luteolina	Ensaio clínico aberto	100 mg/10 kg	26 semanas	50	VABS, ABC, ATEC, CGI-I	Ganhos na função adaptativa (VABS) e comportamento (ABC)	(TALIOU <i>et al.</i> , 2013)
Luteolina	Relato de caso	700 mg + 70 mg bid	12 meses	1	ATEC	Melhora nas estereotípias motoras, hiperatividade e habilidades cognitivas. Redução da enurese.	(BERTOLINO <i>et al.</i> , 2017)
Luteolina	Ensaio clínico aberto	100 mg	26 semanas	40	VABS	Melhora na comunicação, independência diária e domínio social. Melhora no escore total da VABS	(TSILIONI <i>et al.</i> , 2015)
Prednisolona	Série de casos	2 mg/kg	Não reportado	44	CLSQ, FMAER, EEG	Modificação nas respostas na FMAER e melhora de linguagem	(DUFFY <i>et al.</i> , 2014)
Prednisolona	Relato de caso	0.5 mg/kg	1 ano	1	REEL, Vineland, Rosetti, <i>Child Autism Rating Scale</i>	Ganhos na habilidade social, fala e atenção	(SHENOY; ARNOLD; CHATILA, 2000)

Terapia	Estudo	Dose	Período	n (TEA)	Instrumentos	Resultados	Ref.
Prednisona	Relato de caso	0.5 mg/kg	28 semanas	1	WISC-R	Melhora na linguagem e comportamento	(STEFANATOS; GROVER; GELLER, 1995)
Prednisolona	Série de casos	2 mg/kg	30 meses e 48 meses	2	Descritivo	Melhora na linguagem	(MORDEKAR <i>et al.</i> , 2009)
Minociclina	Ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo	100 mg	10 semanas	50	ABC, ESRS	Melhora nas subescalas irritabilidade e hiperatividade	(PARDO <i>et al.</i> , 2013)
Minociclina	Ensaio clínico aberto	1.4 mg/kg	6 meses	11	CGI-I, VABS, DAS-II, NVDQ	Sem respostas positivas	(LEIGH <i>et al.</i> , 2013)
Pioglitazona	Ensaio clínico aberto	30-60 mg	12-16 semanas	25	ABC	Melhora nas subescalas hiperatividade, irritabilidade, letargia e comportamento estereotipado	(BORIS <i>et al.</i> , 2007)
Pioglitazona	Ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo	30 mg	10 semanas	40	ABC	Melhora nas subescalas hiperatividade, irritabilidade e letargia	(GHALEIHA <i>et al.</i> , 2015)
Imunoglobulina Humana Oral	Ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo	140, 420 ou 880 mg	12 semanas	125	MGIS	Sem diferença do placebo	(HANDEN <i>et al.</i> , 2009)
Imunoglobulina Humana Oral	Ensaio clínico aberto	420 mg	8 semanas	12	GSI, ABC, CGI-S	Melhora dos sintomas gastrointestinais e comportamento	(SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2006)
Imunoglobulina Intravenosa	Ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo	400 mg/kg dose única	13 semanas	12	ABC, Lista de sintomas, CPRS	Melhora no escores da ABC e lista de sintomas	(NIEDERHOFER; STAFFEN; MAIR, 2003)

Terapia	Estudo	Dose	Período	n (TEA)	Instrumentos	Resultados	Ref.
Imunoglobulina Intravenosa	Ensaio clínico aberto	400 mg/kg/mensal	6 meses	5	<i>Ritvo-Freeman Real Life Rating Scale</i> , C-YBOCS, CGI-AD, A-NIMH	Sem respostas significativas	(PLIOPLYS, 1998)
Imunoglobulina Intravenosa	Ensaio clínico aberto	154 to 375 mg/kg por dose (1-6 doses)	19 semanas	10	Descritivo	Melhora dos sintomas em 1 caso	(DELGIUDICE-ASCH <i>et al.</i> , 1999)
Imunoglobulina Intravenosa	Ensaio clínico aberto	1 g/kg (10 doses)	31 semanas	14	CCC-2, SRS, ABC, CGI-S, CGI-I, ADOS, PPVT.	Melhora da linguagem e interação social	(MELAMED <i>et al.</i> , 2018)
Células Troncos Mononucleares e Mesenquimais	Ensaio clínico aberto	2 x 10 ⁶ CBMNCs /kg e 10 ⁶ UCMSCs /kg	4 infusões (1 a cada 5-7 dias)	36	CARS, ABC, CGI	Grupo combinado obteve mais benefício que o grupo CBMNC isolado, e ambos apresentaram melhora mais pronunciadas que as terapias comportamentais isoladas	(LV <i>et al.</i> , 2013)
Células Tronco Fetais	Ensaio clínico aberto	*	2 dias	45	ATEC, ABC	Redução da agitação, melhora no contato visual, apetite e afeto	(BRADSTREET <i>et al.</i> , 2014)
Medula Óssea Autóloga derivada de Mononucleares	Relato de caso	56 × 10 ⁶ MNCs intratecal	Dose única	1	CARS	CARS reduziu de severo para não autista, porém a impressão geral era de autismo moderado	(SHARMA <i>et al.</i> , 2013a)
Células Tronco Embrionárias	Série de casos	**	4 sessões de 4-6 semanas	3	SPECT, descritivo	Melhora na coordenação visual, equilíbrio, processamento sensorial, escrita e fala	(SHROFF, 2017)
Concentrado de Medula Óssea	Ensaio clínico aberto	5 ml/kg	Dose única	10	ISAA, Wee-FIM	Melhora nos escores da ISAA	(BANSAL <i>et al.</i> , 2016)

Terapia	Estudo	Dose	Período	n (TEA)	Instrumentos	Resultados	Ref.
Sangue de Cordão Autólogo	Ensaio clínico aberto	1-5 x 10 ⁷ células/kg	Dose única	25	VABS-II, CGI-S, CGI-I, PDDBI, EOWPVT-4, EGT.	Melhora do contato visual e dos escores em todas as escalas	(DAWSON <i>et al.</i> , 2017)
Medula Óssea Autóloga – derivada de Monócitos	Ensaio clínico aberto	8.19 x 10 ⁷ células	Dose única	32	ISAA, CGI-I, FIM, Wee-FIM	Melhora em todas as escalas	(SHARMA <i>et al.</i> , 2013b)
Extratos de Linfócitos Dialisáveis	Ensaio clínico aberto	150 IU	3 dias a cada 6-12 semanas	40	SSSA	Melhora e reversão de sintomas	(FUDENBERG, 1996)

*1.6 ml de suspensão de células hepáticas com contagem de células > 30 x 10⁶ células/ml a cada infusão; 2.29 ± 0.49 ml células progenitoras neuronais com contagem de células > 8.70 x 10⁶/ml por infusão

**0.25 ml of hESCs (< 4 milhões de células) IM uma vez ao dia; 1 ml (< 16 milhões de células) dados 2 vezes por semana IV; 1 to 5 ml a cada 7 dias por rotas suplementares; spray nasal aplicado 2 vezes na semana.

Social Responsiveness Scale (SRS), Clinical Global Impression Severity (CGI-S) Scale, Clinical Global Impression Improvement (CGI-I) Scale, Peabody Picture Vocabulary Test III (PPVT-III), Receptive and Expressive One-Word Picture Vocabulary Tests (ROWPVT), Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS), Childhood Autism Rating Scale (CARS), Extrapyramidal Symptoms Rating Scale (ESRS), Seiken's Critical List for Autistic Children, Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition (VABS), Ability Scales Second Edition (DAS-II), Mullen Scales (NVDQ), Modified Global Improvement Scale (MGIS), Gastrointestinal severity index (GSI), Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC), Clinical Language Status Questionnaire (CLSQ) Receptive-expressive emergent language test (REEL), Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised (WISC-R), Children Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale (C-YBOCS), Autism Modification of the NIMH Global Obsessive-Compulsive Scale (A-NIMH), Symptom severity score average (SSSA), Indian Scale for Assessment of Autism (ISAA), Functional Independent Measure (FIM), Functional Independent Measure for children (Wee-FIM).

Tabela 2 – Eventos adversos

Terapia	Evento adverso	Ref.	Terapia	Eventos adversos	Ref.
Sulforafano	Ganho de peso e possível associação com crise epiléptica	(SINGH <i>et al.</i> , 2014)	Pioglitazona	Elevação de leucócitos, glicemia e enzimas hepáticas transitórias e autolimitadas	(BORIS <i>et al.</i> , 2007)
Lenalidomida	Erupção cutânea e redução da contagem de leucócitos transitórios	(CHEZ <i>et al.</i> , 2012)	Imunoglobulina Humana Oral	Alterações de pele e subcutâneo	(HAND EN <i>et al.</i> , 2009)
Pentoxifilina	Náuseas, vômitos, hipotensão e cefaleia	(SOGAMES, 1978)	Imunoglobulina Humana Oral	Vômitos e erupção cutânea	(SCHNEIDER <i>et al.</i> , 2006)
Pentoxifilina	Limitados ao sistema gastrointestinal	(SHIMODE M, 1981)	Imunoglobulina Intravenosa	Cefaléia e reação no local da infusão	(MELAMED <i>et al.</i> , 2018)
Luteolina	Aumento da irritabilidade	(TALIOU <i>et al.</i> , 2013)	Células Tronco Mononucleares e Mesenquimais	Febre autolimitada	(LV <i>et al.</i> , 2013)
Prednisolona	Síndrome de Cushing, irritabilidade. Sangramento gastrointestinal e hipercalcemia	(DUFFY <i>et al.</i> , 2014)	Sangue de Cordão Autólogo	Reação alérgica, alterações de pele, agitação e infecções da infância	(DAWSON <i>et al.</i> , 2017)
Minociclina	Sintomas gastrointestinais e respiratórios altos; PICA; hematúria; ganho de peso; hiperatividade; infecção do trato urinário, otite média; epistaxe; manchas nos dentes; piora da agressividade, balanceio de cabeça, fotossensibilidade, apetite e rituais	(LEIGH <i>et al.</i> , 2013)	Medula Óssea Autóloga – derivada de Mononucleares	Cefaléia, náuseas e vômitos, dor no local da infusão e crises epilépticas	(SHARMA <i>et al.</i> , 2013b)

10 ARTIGO 1 - IMMUNOLOGICAL DYSFUNCTION IN AUTISM SPECTRUM DISORDER: A POTENTIAL TARGET FOR THERAPY

Immunological dysfunction in autism spectrum disorder: a potential target for therapy

Josemar Marchezan^{1,3,4}, Eduardo Geyer Arrussul Winkler dos Santos^{1,3,5}, Iohanna Deckmann^{1,2,3,6}, Rudimar dos Santos Riesgo^{1,3,4,7}

¹Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Neuroglial Plasticity Group, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation-INCT-NIM.

⁴Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul;

⁵School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul

⁶Postgraduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul

⁷Department of Pediatrics, Child Neurology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a complex neurodevelopment disorder with an unknown etiology and currently few effective therapies. Alterations in immune system in ASD have being demonstrated both in animal models and in humans; thus, the immune imbalance arises as a possible pathway for drug intervention. In this review, the studies were classified into two major groups: 1) clinical research whose authors classify the drugs used with primary anti-inflammatory and immunomodulatory action with the following therapies: sulforaphane, celecoxib, lenalidomide, pentoxifylline, spironolactone, flavonoid luteolin, corticosteroids, oral immunoglobulin, intravenous immunoglobulin, cell therapy, dialyzable lymphocyte extracts, minocycline and pioglitazone; and 2) other therapies already used or currently under study in ASD whose initial characteristics were neither anti-inflammatory nor immunomodulatory, but they played this potential immunomodulation capacity throughout the treatment: risperidone, vitamin D, omega-3, *Ginkgo biloba*, L-carnosine, N-acetylcysteine, microbiome restoration therapies. These studies used different data acquisition methodologies and

are reviewed here. We raised questions such as randomized and placebo-controlled studies with greater number of participants, and the use of biomarkers to refine the treatment of autistic subjects.

Keywords: ASD, autism, immune system, immune therapy, neuroimmune

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a developmental disorder and its core symptoms are 1) deficits in social interaction, communication and language, and 2) repetitive and stereotypical behaviors and/or restricted repertoire of interests [1]. Autism (used here as synonymous with ASD throughout the text) diagnosis has increased dramatically in the past decades [2,3]. In 2018, the Center for Disease Control and Prevention (CDC) estimated the prevalence of ASD to be 16.8 per 1,000 (one in 59) children aged 8 years, affecting 26.6 in 1,000 boys and 6.6 in 1,000 girls (prevalence ratio 4:1) [4]. This represents an increase of approximately 150% between 2000 and 2014 [4], making the disorder a public health problem [5,6]. Studies in Asia, Europe and North America report an average prevalence of ASD around 1% [3].

Despite the increase in the number of cases, the treatments available today partially improve some symptoms presented by the subjects, not completely reversing all the symptoms of ASD [7–9], and only two drugs, risperidone and aripiprazole, are approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of disruptive symptoms in these patients [8,10–14]. Besides, some factors such as 1) the individual injury, with many facets of daily functioning affected [15], 2) the substantial direct and indirect economic effect of treatments and 3) the family suffering reinforce the need for continuous search for effective interventions [16–20].

ASD is a complex neurodevelopment disorder [3], and although a number of definitions and improvements have been made, etiological aspects remain unclear [2,3,21]. However, the contribution of both genetic and environmental factors to the symptoms is consensus in autism research community, leaving no doubt of the multifactorial aspect of the spectrum [2,3,21–23].

Immunological dysfunction has been a recognized feature in autism spectrum disorder for several decades and has been highlighted in recent revisions [2,3,8,15,21–

26]. In 1976 a study found that 5 of 13 autistic children had undetectable antibody titers despite previous vaccine for rubella, while every control subject had detectable titers, making the first suggestion of a link between the immune system and ASD [26,27]. Over the past few decades, studies in animal models and humans have shown evidence of alterations in central and peripheral immune system functioning in ASD, including stimulation of immune cells, generation of autoantibodies, cytokine/chemokine imbalance and increased permeability of the blood–brain barrier (BBB) [2,3,8,15,21–26]. Interestingly, many studies have also demonstrated a correlation between ASD status and cytokine levels and secretion [28–46], levels of immunoglobulin (IgM e IgG) [47], B lymphocyte antigen D8/17 expression [48], serum antineuronal antibodies [49–51], anti-ganglioside M1 antibodies [52] and maternal antibody status [51,53]. These data support the hypothesis that there is a subgroup of ASD individuals that has some form of immune system dysregulation, and that, at least in part, this dysregulation may contribute to the autistic phenotype [2,3,8,15,21–26].

Many researchers suggest the possibility that immune dysfunction in ASD may be a viable pathway for drug intervention, and a subgroup of ASD individuals could benefit from immune-based therapies [2,3,8,21–24,26,54–56]. This review aims to describe drugs that act on the immune system and have been studied in patients with autism.

Methods

The studies in this review were obtained from a comprehensive search of PubMed using the terms and keywords “autism”, “autistic”, “autistic spectrum disorder”, “ASD”, “Rett”, “Asperger”, “Pervasive Developmental Disorder” and “PDD” associated to the terms “treatment”, “inflammation”, “immunological drugs”, “immune”, “inflammation”, “inflammatory”, “anti-inflammatory”, “immunomodulation”, “immunology”, “immunological”, “neuroinflammation”, “neuroinflammatory”, “antibody”, “antibodies”, “immunoglobulin”, “lymphocyte”, “glial activation”, “cytokine”, “immunomodulatory”, “BDNF”, “sulforaphane”, “pregnenolone”, “celecoxib”, “immunoglobulin”, “ACTH”, “lenalidomide”, “pentoxifylline”, “pioglitazone”, “spironolactone”, “corticosteroids”, “probiotics”, “luteolin”, “transplant”, “stem cells”, “cell therapy”, “autologous”, “vitamin D”, “risperidone”, “naloxone”, “minocycline” and

“lymphocyte extract”. The search included articles in English, Spanish and Portuguese. Only studies conducted in humans were included.

Description of findings relating immunological dysfunction in ASD and potential therapies

The inclusion of articles in this review was based on the classification criteria of the original articles, who considered anti-inflammatory or immunomodulatory mechanisms of action in ASD therapies: 1) Clinical research whose authors classify the drugs used with primary anti-inflammatory and immunomodulatory action with the following therapies: sulforaphane, celecoxib, lenalidomide, pentoxifylline, spironolactone, flavonoid luteolin, corticosteroids, oral immunoglobulin, intravenous immunoglobulin, cell therapy, dialyzable lymphocyte extracts, minocycline and pioglitazone (Table 1). The side effects of these therapies are also described (Table 2); and 2) other therapies already used or currently under study in ASD whose initial characteristics were neither anti-inflammatory nor immunomodulatory, but they played this potential immunomodulation capacity throughout the treatment: risperidone, vitamin D, omega-3, *Ginkgo biloba*, L-carnosine, N-acetylcysteine, microbiome restoration therapies.

Sulforaphane

Sulforaphane is an isothiocyanate derived from various *Brassica* vegetables (especially broccoli) [57] with anticancer effect [58] and potential protective effect in neurodegenerative diseases [57]. This therapeutic effect is based in up-regulation of gene transcription related to cell mechanisms of protection against oxidative stress, inflammation, DNA-damaging electrophiles and radiation [59].

A placebo-controlled, double-blind, randomized trial evaluated the effect of sulforaphane for up to 18 weeks in 40 male patients with ASD (26 sulforaphane-treated and 14 placebo-treated), at a dose of 50-150 μmol per day. In the treatment group, the Aberrant Behavior Checklist (ABC) mean score differed at 4, 10, and 18 weeks compared to baseline score, and especially at 18 weeks, there was a 34% decrease in the ABC score and 17% in the Social Responsiveness Scale (SRS) score. Significant improvement was observed in irritability, lethargy, stereotypy and hyperactivity subscales of the ABC, and

in awareness, communication, motivation and mannerism subscales of SRS. After stopping sulforaphane treatment, both ABC and SRS subscores tended to return to the baseline score. On subscale analysis of Clinical Global Impression Improvement Scale (CGI-I) scores at 18th week, sulforaphane users were much improved on social interaction, aberrant behavior and verbal communication compared to placebo-treated subjects. Sulforaphane treatment was safe and well-tolerated, but higher weight gain over the period was observed compared with placebo. Two participants had single unprovoked seizures; their relation to sulforaphane use could not be ruled out, is possible that seizures occurred as a reflex of an adverse effect of sulforaphane [59]. After 2 years, the researchers reassessed the patients' progress. Among 16 patients, one family reported a maintained behavioral improvement even after the discontinuation of sulforaphane use, and nine families were still taking sulforaphane with improvement [60].

Celecoxib

Celecoxib is a nonsteroidal anti-inflammatory drug that reduces the production of cytokine-induced activation of COX-2 and inhibits NF-kB pathway [61,62]. Celecoxib was used as associated therapy in the ASD treatment in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Forty children were randomly allocated to celecoxib+risperidone or placebo+risperidone groups for 10 weeks. The used dose was 200 mg/day for patients weighing less than 30 kg and 300 mg/day for patients over 30 kg. At week 10, the risperidone+celecoxib group demonstrated significant improvements in irritability, social withdrawal and stereotypic behavior evaluated in ABC subscales when compared to risperidone + placebo. No significant difference was observed between the two groups regarding extrapyramidal symptoms or other side effects [63].

Lenalidomine

Lenalidomide is an analogue of thalidomide used in myelodysplastic syndromes and more recently for therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation [64]. This medication has lower toxicity and greater modulatory potency of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and other immunomodulatory cytokines than thalidomide. The lenalidomine arises as a possible treatment in patients with elevated

TNF- α in serum or cerebrospinal fluid (CSF), as well as interleukin 1 (IL-1), IL-6, or methyl CpG-binding protein 1 (MeCP-1) [65].

An open-label study was conducted with 7 autistic males subjects aged 6 to 12 years with elevated TNF- α in CSF (>50 pg/mL) to evaluate the effects of daily treatment with lenalidomide (2.5 mg) for 12 weeks, with evaluation at weeks 6 and 12. At the end of the study, serum and CNS TNF- α were reduced by 57%, but this reduction did not reach statistical significance. Six children who completed the 6-week follow-up showed decreased symptoms of autism based on the Childhood Autism Rating Scale (CARS), CGI expressive language, CGI receptive language but not in One-Word Receptive Language Testing Scores (ROWPVT). With 12 weeks of follow-up the CGI expressive language remained improved from baseline, but CGI assessment of receptive language and CARS showed similar values. Differences in social skills scores were not significant compared to baseline. Three patients were withdrawn from the study because of reactions to the drug, and after stopping use, the symptoms disappeared [65].

Pentoxifylline

Pentoxifylline (PTX) is a xanthine analog known as a phosphodiesterase inhibitor [66] with modulatory effects on cytokines such TNF- α , IL-10 and interferon gamma (IFN- γ) [67], being proposed as a potential treatment for autistic patients in the 1970s and 1980s. Gupta *et al.* described 5 case series in a 1996 review [68,69]: 1) twenty-three ASD children were treated with PTX (150-600 mg/day orally). Within 1 month of therapy, the drug was considered to be “remarkably effective” in 10 cases, “fairly effective” in eight cases, “slightly effective” in three cases, and had “no effect” in two patients. The side effects, in a small number of patients, included nausea, vomiting, low blood pressure and headache [70]; 2) Thirty ASD children were evaluable after receiving PTX (without dosage or duration of treatment specified). Six patients (20%) showed marked improvement in behavior and 14 (47%) showed slight amelioration of symptoms [71]; 3) Shimoido treated 20 male ASD patients with PTX (most of the patients received 200 mg/day) for 3 months. Patients were evaluated by mental development scale for young

children, Seiken's Critical List for Autistic Children, and patient's behavior in specific situations. In 35% of patients, improvement was observed in at least two of three assessments. Side effects were limited to gastrointestinal tract [72]; 4) Results of treatment of 18 psychotic and two autistic children (a boy of 5 years and a girl of 7 years) with PTX (200 mg/day in the majority of patients) for 4 to 10 months revealed "highly positive" improvements in behavior (12 children) and in language (14 children). In the autistic children, improvement in pronunciation of syllables and words was noted. The side effects included excitation (three patients) and disturbed sleep (two patients), which disappeared without discontinuation of PTX [73]; 5) PTX was administered to 20 children with early infantile autism at 10 to 15 mg/kg/day split in two doses, for 3 months, with the aim of evaluating electroencephalogram (EEG) activity changes through autoregressive analysis software (ARASIS). EEG before and after PTX showed significant differences in 7 (39%) of 18 patients. The "playing with a friend" and "personal communication in a psychopathological test" were improved [74].

A placebo-controlled, double-blind trial randomized forty patients to either PTX+ risperidone or placebo + risperidone for 10 weeks, with evaluations at baseline and at weeks 2, 4, 6, 8 and 10. The dose of PTX was 400 mg/day for children between 10 and 40 kg and 600 mg for children weighing above 40 kg. The group risperidone + pentoxifylline demonstrated significantly greater improvement in five ABC subscales: irritability, social withdrawal, stereotypic behavior, hyperactivity, and inappropriate speech. No differences in extrapyramidal symptoms or side effects were observed [75].

Spironolactone

Spironolactone is a synthetic 17-lactone steroid, belonging to "potassium-sparing diuretics" class of drugs and known as a competitive aldosterone antagonist [76] with potent anti-inflammatory, immunologic and hormone modifying properties [77–80].

Currently, this drug has been used for acne, hirsutism and precocious puberty, demonstrating safety and tolerability [81]. Bradstreet *et al.* (2007) reported a case of a 12-year-old autistic boy with immune dysregulation, food allergies and elevated testosterone levels. He demonstrated significant reductions in both severity and frequency of several aberrant symptoms during four weeks of spironolactone daily administration (dose of 2 mg/kg). Comparing the ABC scores before and after the spironolactone implementation, there was a 79% improvement in irritability, an 83% decrease in lethargy, a 60% reduction of stereotypy, a 72% reduction of hyperactivity and a 67% decrease in inappropriate speech. There was a receptive language gain of 21 months, indicating an increase in vocabulary greater than one standard deviation at either age level evaluated Peabody Picture Vocabulary Test III (PPVT-III) [81].

Flavonoid luteolin

Luteolin is a natural flavonoid with antioxidant and anti-inflammatory properties found in a myriad of plants [82]. Dietary sources of flavonoid luteolin include carrots, peppers, oregano and olive oil [83]. In humans, luteolin has been demonstrated to inhibit secretion of pro-inflammatory mediators from mast cells [84].

In a study, 37 ASD children (29 boys and 8 girls, ranging from 4 to 14 years old) received a dietary flavonoid formulation (NeuroProtek®) containing mainly luteolin (100 mg). 75,67% of subjects had improvement in stool color, shape or smell; 51,35% got fewer "allergic problems"; 40,54% started to have better eye contact; 40,54% showed more retention of learned aspects; 37,83% had more social interaction; 32,43% improved their attention to directions; and 10,81% got better in speaking words or sentences. This study lacked any specific psychometric instrument or an independent assessment by and external evaluator. The authors do not clarify treatment or follow-up duration [85].

Another open-label trial assessed the same dietary supplement (100 mg of luteolin) in 42 boys and 8 girls aged 4-10 years, for a 26-week period. Primary outcomes were age-equivalent scores in the 3 domains (Communication, Daily Living Skills, and

Social domain) of the Vineland Adaptive Behavior Scale (VABS). Secondary outcomes were the ABC, the Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) and the CGI-I scores. There was significant improvement in adaptive functioning (communication domain, daily living skills and social domain) as measured by using the VABS age-equivalent scores, as well as in overall behavior as indicated by the reduction in ABC subscale scores. There was a transient period (1-8 weeks) of increased irritability in 27 of the 50 participants. [86].

In a 2015 work, 40 patients diagnosed with ASD received luteolin-containing dietary formulation for 26 weeks, reducing autism symptoms and TNF and IL-6 seric levels. At baseline, IL-6 levels were elevated in ASD subjects (with no statistical significance); TNF seric levels were significantly higher in ASD patients. Interestingly, there were 2 subgroups of ASD subjects in this study: low and high serum IL-6 and TNF levels. The latter group ($n = 10$) had significant improvement in the VABS age-equivalent scores for all domains; the VABS composite score was significantly higher as well. In 26 weeks of treatment, ASD patients improved in several behavioral domains equivalent to 9.73 months in the communication domain, 8.09 months in the social domain and 6.64 months in the daily living abilities [87].

In a recent study, an association of palmitoylethanolamide + luteolin (700 mg + 70 mg twice a day for one year) was given to a 10-year-old male autistic patient. The evaluation with the ATEC questionnaire showed a decrease in scores, showing improvement in behavioral results. The treatment reduced stereotypic behaviors, significantly improved the cognitive domain (observed by parents and teachers) and, curiously, decreased enuresis of the subject after 14 months of treatment [88].

Corticosteroids

Corticosteroids are anti-inflammatory drugs that inhibit secretion of pro-inflammatory mediators, alter T cells activity and may also interfere with microglial activation [89]. One retrospective study with oral prednisone (2 mg/kg/day for 9-12 months) treatment assessed ASD patients regarding Clinical Language Status Questionnaire (CLSQ) scoring, Frequency Modulated Auditory Evoked Response

(FMAER) testing and EEG. For the treated group (20 participants), 9/14 electrode measurements of FMAER's 4 Hz response had a statistically significant modification, more importantly at left posterior-inferior temporal electrode (TP9). On the other hand, no difference was seen in the control group (24 non-treated subjects). The EEGs from treated and control groups showed no differences. Steroid-treated group also had a significant increase in the mean CLSQ after therapy [90].

Shenoy *et al.* reported response to steroid therapy in a case of ASD secondary to an autoimmune syndrome. The patient was treated with different regimens of oral prednisolone, with an average dose of 0.5 mg/kg daily. The ASD symptoms improved progressively during the course of 1 year following the end of corticosteroid therapy [91]. In a similar study, a child with language and behavior regression at 22 months of age (diagnosed later with Pervasive Developmental Disorder) received prednisone (2mg/kg/day) for 28 weeks. The results observed were speech amelioration, better responsiveness to verbal communication, improved social relationships and decrease of motor stereotypies [92].

Morderkar and collaborators reported 2 patients diagnosed with childhood disintegrative disorder that were also treated with corticosteroids, showing similar clinical improvement. After 2 mg/kg daily prednisone treatment, the first patient showed a recovery of speech at day 11 of therapy. The second subject, with treatment of one week in the same dose, had progressive speech improvement over the course of 48 months [93].

In the 90's, several studies were conducted with Org 2766, a Synthetic Analog of the Adrenocorticotrophic Hormone (4-9). However, Org 2766 has no substantial steroidogenic activity and may exert its effects via an interaction with endogenous opioid systems [94–98]. Another open-label study using neurosteroid pregnenolone found improvements in ASD patients. Considering that this drug did not alter cortisol levels, the

authors suggest that pregnenolone would act by modulating GABA_A receptors, altering ratio of excitation/inhibition in key neural systems [99,100].

Oral immunoglobulin

Oral immunoglobulin, constituted predominantly of IgG, is a medication prepared from immunoglobulins obtained from human and bovine serum and bovine milk. Several studies demonstrate its survival at gastric exposure and resistance to proteolytic digestion in gastrointestinal tract [101].

Schneider *et al.* administered oral immunoglobulin in a pilot study with 12 male ASD subjects, considering the chronic gastrointestinal disturbances in ASD due to underlying deficiency in mucosal immunity. By the fourth week assessment, 50% of subjects had improvement in gastrointestinal symptoms [102].

Similarly, Handen and colleagues tested oral human immunoglobulin efficacy in gastrointestinal symptoms in ASD. One hundred and twenty-five ASD children were treated with different doses of immunoglobulin (140 mg/day, 420 mg/day or 840 mg/day) or placebo. The primary outcome was measurement by a Modified Global Improvement Scale (MGIS), which had no significant changes between the groups [103].

Intravenous immunoglobulin

Intravenous immunoglobulin (IVIG) is a treatment that contains a pool of several molecules of IgG from the human plasma (more than 95% unmodified IgG) [104]. Although it is widely used, the mechanism of action of IVIG for the treatment of autoimmune disorders is still unclear [23].

A letter reported a clinical trial with 12 male ASD children receiving a single dose of IVIG (0.4 g/kg) or placebo evaluated after 6 or 13 weeks of therapy. There were significant improvements in irritability, hyperactivity, inadequate eye contact and

inappropriate speech in ABC scale, besides better scores on drowsiness. There were no side effects caused by the treatment [105].

In an open clinical trial, 5 children diagnosed with autism received monthly IVIG infusions at the dose of 400 mg/kg for 6 months. No improvement was noted and side effects are not cited [106]. In another open label trial, 10 ASD children with blood immunologic abnormality, such as increased percentage of lymphocytes expressing the DR antigen, received from one to six IVIG infusions of 154 to 375 mg/kg according to the patient. In 5 cases, no improvement was perceived; in 4 cases, parents noticed mild amelioration of attention and hyperactivity, but no differences in core symptoms of autism. One child of 5 years old who received 375 mg/kg infusions had remarkable relief of autistic symptoms (e.g. started to speak for the first time). There were no adverse effects [107].

A recent pilot study investigated the efficacy and tolerability of IVIG through ten infusions of 1 g/kg every 21 ± 7 days in 14 autistic patients with immunological imbalance (e.g. T or B cell dysfunction, recurrent infections, among others). The amelioration in behavioral symptoms was measured through SRS, PPVT, Children's Communication Checklist-2 (CCC-2), ABC and Autism Diagnostic Observation Scale (ADOS) scales. In SRS, there was significant improvement in overall score, autistic mannerisms score, social cognition score and social motivation score. In CCI-2, advances in speech and semantics domains were reported. In ABC, scores did not alter. On the other hand, the ADOS scores changed significantly in stereotyped behaviors and restricted interests, in communication and social interaction and in reciprocal social interaction. In relation to immunological markers after treatment, there were alterations in TNF- α and IL-1 β . Adverse events to intravenous immunoglobulin included mild headaches and infusion-site reactions [108].

Cell therapy

Conceptually, cellular therapy with hematopoietic stem cells (HSC) – as cord-derived and bone marrow-derived - may help the inflammation balance through immune regulation [109]. An open trial studied 36 ASD patients treated with placebo, Cord Blood Mononuclear Cells (CBMNC) or Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells (UCMSCs) + CBMNC association. The only adverse event reported during the follow-up period was a self-limited low-grade fever in five subjects in the combination treatment group. Similarly, no significant hepatic, renal, hematological and metabolic abnormalities occurred after therapy. Both intervention groups showed significant improvement on CARS and total ABC scores at 24 weeks in comparison to baseline, and the combination group presented better results than the CBMNC group. Statistically significant differences were also shown on CGI evaluation in the two treatment groups compared to controls at 24 weeks post-treatment [110].

The efficacy and safety of Fetal Stem Cells (FSC) therapy was verified in 45 ASD subjects through ATEC and ABC scores, and laboratory tests and clinical examination. After 6 months of therapy, B cell counts decreased significantly, while CD3 and CD4 counts were increased in 12 months post-treatment. A Significant lowering of ATEC overall score was seen 12 months after therapy and total ABC scores in the sixth and twelfth months. No side effects were observed [111].

Initially, Sharma *et al.* used Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMNCs) intrathecally in a 14-year-old boy, noting symptomatic improvement, with change in CARS from severely autistic to non-autistic, and enhanced brain function by positron emission tomography-computed tomography (PET-CT) [112]. Posteriorly, an open label proof of concept study used intrathecal BMMNCs transplantation in association with occupational, speech and psychological therapies in 32 ASD patients. There was significant difference between prior and post-treatment CGI-I scores and total Indian Scale for Assessment of Autism (ISAA) scores. All ISAA domains also showed significant decreases. Functional Independence Measure (FIM) and Wee-FIM scores had no difference. PET-CT detected changes in glucose metabolism in the form of FDG uptake in different cerebral regions. Seizures and minor adverse events, such as headache, nausea, vomiting and pain related to procedure were reported [113].

An open-label trial tested the effects of intrathecal administration of Autologous Bone Marrow Concentrate (BMAC) cell therapy in 10 subjects with autism. Mean ISAA score of the patients decreased (improved) 8% in the first 3 months after BMAC injection, and further diminished 6% from 3 to 6 months. Wee-FIM scoring changes did not reach statistical significance. The patients showed no adverse reactions [114].

Another open-label clinical trial tested the safety and feasibility of administering Autologous Cord Blood infusion to 25 ASD children. Significant improvements in behavior were found across a wide range of outcome measures: VABS-II Socialization domain, CGI-I, Pervasive Developmental Disorder Behavior Inventory (PDDDBI) and Expressive One-Word Picture Vocabulary Test - 4 (EOWPVT). Most of the observed behavioral changes occurred during the first 6 months and were sustained between 6 and 12 months. Higher nonverbal IQ was associated with greater improvements. The Eye-Gaze Tracking showed a 20% increase in the chance of children to gaze at an actress's eyes. Mild adverse events were seen: allergic reactions to infusion, skin changes, agitation and common childhood infections [115].

Lastly, a case series report describes improvement in 3 children with autism after infusion of Human Embryonic Stem Cells (hESCs). Better communication, attention to gaze and cognitive performance were observed, besides improvement in brain blood perfusion reflected in the PET-CT. No side effects to the treatment were noted [116].

Dialyzable lymphocyte extract

Dialyzable lymphocyte extracts (DLE) are complexes of low-molecular-weight substances with possible action of cell-mediated immunity transfer, mainly due to action of small peptides called *transfer factors* [117]. A study published in 1996 reported a follow-up of forty 5-year-old patients with classical infantile autism and pseudo-autism after three and a half years of DLE therapy. Twenty-eight patients showed improvement and 10 had remission of autistic symptoms. The article doesn't clarify the criteria used to define autism and pseudo-autism [118].

Minocycline

Minocycline is a tetracycline antibiotic with potent anti-inflammatory and neuroprotective effects [119,120]. The exact immunomodulatory mechanism of

minocycline is not clear [121]. Minocycline decreases microglial activation, modulates pathways involved in neuroinflammation, such as cytokine and chemokine networks (for example, IL-6, IL-1 β and TNF- α) and reduces the activity of some metalloproteinases [122,123]. Clinical trials on patients with X-frangible syndrome have shown minocycline to be effective and safe in improving behavioral function [124,125].

An open-label pilot trial was assessed with eleven ASD children treated with minocycline (1.4 mg/kg/day) + vitamin B6 (0.6 mg/kg, to mitigate the potential for vestibular side effects) therapy [126]. Clinical improvements were negligible, with CGI-S scores remaining stable and only two of ten children demonstrating ‘minimal improvement’ on the CGI-I. VABS composite scores also showed little or no change. Adverse events reported by parents included gastrointestinal and upper respiratory symptoms, hematuria, weight gain, PICA, hyperactivity, urinary tract infection, otitis media, epistaxis, teeth staining, increased aggression, head-banging, sensitivity to lights, increased appetite and ritualistic behavior. Laboratory assays demonstrated significant changes in the expression profile of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and hepatic growth factor (HGF) in CSF and serum. Among the evaluated cytokines, only IL-8 was significantly reduced in serum after treatment, with no changes in CSF. No significant pre- and post-treatment changes were seen in the profiles of plasma metalloproteinases.

Ghaleiha *et al.* conducted a randomized, double-blind, placebo-controlled trial with 50 ASD children that received minocycline (50 mg twice a day) + risperidone or placebo+risperidone for 10 weeks. The risperidone dose was 1 mg/day for patients weighing less than 20 kg and 2 mg/day for those weighing 20 kg or more. Significantly greater score reduction in the irritability and hyperactivity/noncompliance subscales in ABC scale occurred in the minocycline group compared with the placebo group at week 10 [127].

Pioglitazone

Pioglitazone belongs to the thiazolidinedione group and works via peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) [128]. This drug is frequently used as an anti-diabetic agent and offers additional cardiovascular protection and lipid profile

improvement [129]. PPAR ligands also have anti-inflammatory effects, down-regulating or up-regulating different components of the inflammatory response [130]. Thiazolidinediones have been tested in inflammatory disorders such as psoriasis [130] and asthma [131]. Pioglitazone effects on neuropsychiatric diseases have also been studied [132].

An open-label study evaluated the use of pioglitazone in 25 ASD subjects (ages ranging from 3 to 17 years) for 12 to 16 weeks with daily doses of 30mg (ages 3-5 years old) or 60mg (ages 6-17 years old). Analysis revealed significant decrease in four ABC subscales after the administration of pioglitazone: hyperactivity, irritability, lethargy and stereotypy. 76% of the patients showed a 50% reduction in at least one subscale, and there was a tendency for younger participants to benefit more from pioglitazone. Transitory and self-limited elevations in white blood counts, glucose levels and liver enzymes were noted [133].

Ghaleiha *et al.* conducted a double-blind placebo-controlled trial of pioglitazone (30 mg/day) as adjunctive treatment to risperidone during 10 weeks in 44 patients with ASD (aged 4-12 years old). Pioglitazone group showed significantly greater improvement in three ABC subscales: hyperactivity, irritability and lethargy. Frequency of adverse effects was similar between intervention and control groups [134].

Risperidone

Risperidone, an atypical antipsychotic, is widely used in the treatment of children with autism by decreasing major behavioral disturbances in this disorder, such as irritability, aggression and anxiety [135]. Studies suggest immunoregulatory effects of risperidone treatment, since risperidone rescued several immunological changes (expression of inflammatory cytokines, IL-1 β , TNF- α , among others) [136–138]. In autism, risperidone treatment was associated with decreases in serum levels of Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). In addition, mean values of IL-5 were significantly higher in the group that responded to risperidone than in no responders [139]. On the other hand, a previous study with subjects with ASD found no changes in serum inflammatory markers after risperidone use despite clinical improvement [140].

Therefore, the association between immunological changes and clinical response is a possibility that should be further investigated.

Supplements

1) Vitamin D

Vitamin D deficiency has been implicated as a potential environmental factor linked to some autoimmune disorders and plays an immunomodulatory role [141,142]. Several studies have found lower levels of vitamin D in ASD children than in healthy controls [143–145]. Mostafa and Al-Ayadhi reported that vitamin D deficiency could be involved in autoantibody production in patients with autism [141], and Cannell suggested that vitamin D may reduce the severity of autism symptoms through its anti-inflammatory actions [146]. A case report [147], along with open and controlled trials [142,148], has observed ASD symptom scores reduction after vitamin D3 supplementation. However, recent placebo-controlled clinical trials have found divergent results following vitamin D3 supplementation in ASD [149,150].

2) Omega-3

Omega-3 fatty acids have anti-inflammatory and immune modulation properties [151–153]. Supplementation with omega-3 decreases NF- κ B, IL-12 and IL-13 gene expression [154], macrophage inflammatory protein-2 (MIP2), IL-6 [155], IL-17A [156] and TNF- α [155–158]. Despite being widely used as an alternative practice in children with ASD [159,160], Omega-3 supplementation cannot be recommended for ASD children based on current available evidence [151,160–164].

3) *Ginkgo biloba*

Ginkgo biloba (Ginkgoaceae) is an ancient Chinese tree with anti-inflammatory effect [165] and one of the most globally consumed phytomedicines [166]. The effect of *Ginkgo biloba* on ASD has been studied in an open trial [167] and a double-blind, placebo-controlled trial as adjuvant therapy to risperidone [168], with 3 and 47 patients, respectively. It appears to be safe and well tolerated but did not demonstrate efficacy in autistic symptoms.

4) L-Carnosine

L-Carnosine is a dipeptide of the β -alanine and l-histidine amino acids. It is easily absorbed in the digestive tract, penetrates through blood-brain barrier, has high bioavailability and membrane-stabilizing action [169]. Carnosine is a known antioxidant and neuroprotective agent [170,171] and reduces inflammation and neurodegeneration by lowering TNF- α and nitric oxide synthesis [172]. The beneficial effects of L-carnosine on ASD symptoms could be attributed to immunomodulatory, antioxidant, glutamatergic, NMDA- and GABA-modulatory activities [173]. Two randomized, placebo-controlled trials studied L-carnosine in ASD children in the dose of 800 mg/day. Chez *et al.* evaluated 31 children for 8 weeks and found changes in multiple domains in the group that was given carnosine (receptive speech, social attention and behavior.) [174]. Posteriorly, Hajizadeh-Zaker *et al.* used L-carnosine+risperidone or placebo+risperidone for 10 weeks in 50 children. They found improvement in the hyperactivity/noncompliance ABC subscale in the L-carnosine group [173]. A recent placebo-controlled clinical trial using 500 mg of L-carnosine for 2 months observed reduction in sleep duration, parasomnias and total sleep disorders score, but no change in behavior in ASD children [175].

5) N-acetylcysteine

N-acetylcysteine (NAC) is an orally bioavailable prodrug of cysteine known for its use in acetaminophen overdose [176]. With anti-inflammatory properties through several cellular processes [177], NAC is a glutathione precursor and direct antioxidant, and hence inhibits upstream events leading to NF- κ B activation and other proinflammatory cytokines [177]. NAC also acts inhibiting the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6, at the protein and microRNA levels, in lipopolysaccharides (LPS)-activated macrophage cell lines [178,179].

Marler *et al.* reported a case of a 4-year-old boy who showed improvement in refractory self-injury after NAC use, with symptoms returning after stopping the medication and improving again after its restart [180]. Other case report also describes improvement in severe aggression in adolescents after use of NAC associated with quetiapine [181]. Ghanizadeh reported gains in social interaction, communication, hyperactivity, limited interests and aggressive behaviors in a 8-year-old boy after NAC

use [182]. A randomized, placebo-controlled trial by Hardan *et al.* demonstrated a significant reduction in irritability symptoms in 29 children with ASD [183]. Additionally, two randomized, placebo-controlled trials of NAC in conjunction with risperidone for treatment of irritability in patients with ASD (50 and 40 participants) also showed a significant reduction in ABC Irritability subscale scores in the NAC-treated groups [184,185]. More recently, two randomized, placebo-controlled trials found no benefit of NAC in children with autism [186,187].

6) Microbiome restoration therapies

There is an elevated prevalence of gastrointestinal (GI) disturbances in patients with ASD, such as fluctuations in bowel habits, chronic abdominal pain and flatulence. Interestingly, untreated GI symptoms may worsen core behavioral symptoms. A proposed mechanism for these phenomena is a disruption in the “gut-brain axis”, a communication between enteric nervous system and CNS. It has been suggested that the gut-brain axis conveys fundamental signals for neurodevelopment, and that its malfunctioning could be associated with the onset of neuropsychiatric disorders, such as ASD [188].

Gut microbiota might be the agents of disruption in the gut-brain axis, through indirect effects on the innate immune system. Changes in gut microbiome are thought to be related to decreased integrity of intestinal barrier, leading to augmentation of toxins absorption (e.g. lipopolysaccharides). Lipopolysaccharides (LPS) can act on hepatocytes, inducing secretion of TNF- α , which in turn stimulates production of pro-inflammatory cytokines systemically, ultimately leading to brain microglial activation [189]. Hence, based on these statements, researchers suggest that strategies of restoring physiological gut microbiome, such as probiotic supplementation and fecal microbiota transplant, might be able to improve GI and behavioral symptoms in ASD [190]. Sandler *et al.* described in 2000 a series of autistic patients with regressive autistic traits and chronic diarrhea. Treatment with the antibiotic vancomycin was successful in providing short-term improvement in 8 of 10 children, but the gains did not endure [191].

One research paper by Kałużna-Czaplińska *et al.* presented results with probiotic dietary supplement, which decreased fungal urinary biomarker (D-arabinitol) and improved ability of concentration and carrying out others in subjects diagnosed with ASD [192]. Similarly, an open-label study published in 2017 tested the effects of fecal

microbiota transfer on autistic subjects, and the authors reported an improvement of GI symptoms as high as 80%, and also a significant amelioration of behavioral disturbances [193]. Lastly, a clinical trial randomized infant participants to receive either placebo or probiotic dietary supplement during the first 6 months of life. While 6 of 35 subjects in the control group developed either Attention Deficit and Hyperactivity Disorder or Asperger Syndrome later in life, none of the probiotic group had the same outcome [194].

Discussion

ASD is a complex neurodevelopment disorder [3], and studies in animal models and humans demonstrate alterations in immune system in the spectrum [2,3,8,15,21–26]. Several studies correlate ASD symptoms and immune status [28–48,50–53], supporting the hypothesis that there is a subgroup of ASD individuals who could benefit from immune-based therapies [2,3,8,21–24,26,54–56].

The ability of anti-inflammation/immunological modulation has been proposed in drugs routinely used for neurological and psychiatric diseases in spite of their original mechanism of action. Aripiprazole, an antipsychotic approved by the FDA for use in ASD [14], displays immunological properties in *in vitro* experiments [195] and limits inflammatory processes by enhancing anti-inflammatory signaling in schizophrenia [196]. Valproic acid, a short-chain fatty acid used as a mood stabilizer and anti-epileptic drug [197], may have anti-inflammatory as well as antioxidative effects [198–200]. The potential role of serotonergic transmission and NMDA receptors in the modulation of neuroinflammation has also been studied and could open new therapeutic perspectives to address behavioral deficits in ASD [24,54]. Buspirone [95,201–203], fluoxetine [204–208], escitalopram [209,210], citalopram [211], sertraline [212–214], D cycloserine [186,215–218], amantadine [219] and memantine [220–222] have already been used in clinical research in autism. Finally, naltrexone, a potent opiate antagonist tested in ASD for improvement of behavioral changes [223–239], could also possess immunomodulatory action [240].

Currently, no available therapy can reverse the core symptoms of autism. The use of immune-based therapies may be a possible treatment route for some individuals, but few studies aimed at immunomodulation were performed in ASD patients. These studies cover an extensive range of drug classes, including plant products, dietary supplements,

probiotics, antibiotics, anti-inflammatory agents, immunomodulators, cell therapies and even curious substances such as camel milk [241,242]. Most of these studies consist of case reports or open trials, with no control group. Few trials are placebo-controlled and have a sufficient number of participants to generate reliable findings. The heterogeneity of studied populations (considering age, ethnic origin and severity of symptoms), the disparity in ASD diagnostic criteria and the variety of psychological evaluation tools make it difficult to compare different findings. In addition, many of the reports show important methodological flaws. Discrepant results between different studies on the same therapy are also frequent, and the ASD symptoms which show improvement vary considerably. Lastly, there are few publications on each intervention, so further studies are needed in order to obtain consistent data.

It is possible that only part of the patients included in studies had immune dysfunction contributing to their symptoms' etiology. Consequently, positive responses to a specific therapy in these patients could be overlooked when analyzed among a pool of non-responders. The development of potential biomarkers of immune dysregulation and their correlation with phenotypic variability should increase the possibility of pre-selecting patients with greater potential for gains with immunomodulatory interventions. Inflammatory markers, including miRNA targets, seem to hold potential for the development of individualized treatment strategies in the future [3,243–247]. (Figure 1).

Despite discrepancies in results and methodological limitations found in the studies cited in this review, the existence of a subgroup of ASD patients who are true responders to immunological treatment cannot be excluded. Studies to investigate this possibility must be carried out, and the effectiveness of therapies previously tested in humans or animal models should be evaluated. Drugs with anti-inflammatory potential such as donepezil, resveratrol, fingolimod have demonstrated positive findings in animal models of ASD [248–255], demonstrating their promising therapeutic potential, so further research is encouraged.

Conclusions

The development of effective therapies in ASD is urgent. Despite immune dysfunction being a possible pathway for drug intervention in a subgroup of ASD individuals, few studies aiming an immunomodulatory action were performed. Besides,

the use of potential biomarkers as screening tools may enable the selection of specific subjects for clinical trials and, in the future, determine which patients could benefit from a particular therapy. Most of the studies included in this review are not placebo-controlled and use different methodologies, making the interpretation of different results a challenge. Studies with a greater number of participants, randomized and placebo-controlled, either with interventions already described in humans or with new therapies from translational studies in animal models are needed.

Acknowledgements

We are grateful to the Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, School of Medicine (UFRGS) and Translational Research Group in Autism Spectrum Disorder (GETTEA- UFRGS) for the opportunity to work on the project.

References

- 1 Association AP: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®). American Psychiatric Pub, 2013.
- 2 Gottfried C, Bambini-Junior V, Francis F, Riesgo R, Savino W: The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry* 2015;6:121.
- 3 Noriega DB, Savelkoul HFJ: Immune dysregulation in autism spectrum disorder. *Eur J Pediatr* 2014;173:33–43.
- 4 Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, *et al.*: Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ* 2018;67:1–23.
- 5 Brentani H, Paula CS de, Bordini D, Rolim D, Sato F, Portolese J, *et al.*: Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. *Rev Bras Psiquiatr* 2013;35:S62–S72.
- 6 Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG: The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med* 2015;45:601–613.
- 7 Benvenuto A, Battan B, Porfirio MC, Curatolo P: Pharmacotherapy of autism spectrum disorders. *Brain Dev* 2013;35:119–127.
- 8 Mead J, Ashwood P: Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunol Lett* 2015;163:49–55.
- 9 Rossignol DA: Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: a systematic review. *Ann Clin Psychiatry Off J Am Acad Clin Psychiatr* 2009;21:213–236.
- 10 Kaplan G, McCracken JT: Psychopharmacology of autism spectrum disorders. *Pediatr Clin North Am* 2012;59:175–187, xii.
- 11 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 adolescents with irritability

- associated with autistic disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2009;48:1110–1119.
- 12 Owen R, Sikich L, Marcus RN, Corey-Lisle P, Manos G, McQuade RD, *et al.*: Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescents with autistic disorder. *Pediatrics* 2009;124:1533–1540.
 - 13 Randomized, controlled, crossover trial of methylphenidate in pervasive developmental disorders with hyperactivity. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:1266–1274.
 - 14 LeClerc S, Easley D: Pharmacological therapies for autism spectrum disorder: a review. *P T A Peer-Reviewed J Formul Manag* 2015;40:389–397.
 - 15 Masi A, Glozier N, Dale R, Guastella AJ: The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Neurosci Bull* 2017;33:194–204.
 - 16 Buescher AVS, Cidav Z, Knapp M, Mandell DS: Costs of Autism Spectrum Disorders in the United Kingdom and the United States. *JAMA Pediatr* 2014;168:721.
 - 17 Karst JS, Van Hecke AV: Parent and family impact of autism spectrum disorders: a review and proposed model for intervention evaluation. *Clin Child Fam Psychol Rev* 2012;15:247–277.
 - 18 Smith LE, Greenberg JS, Mailick MR: The family context of autism spectrum disorders: influence on the behavioral phenotype and quality of life. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2014;23:143–155.
 - 19 Weiss JA, Cappadocia MC, MacMullin JA, Vecili M, Lunsy Y: The impact of child problem behaviors of children with ASD on parent mental health: the mediating role of acceptance and empowerment. *Autism Int J Res Pract* 2012;16:261–274.
 - 20 Marchezan J, Becker M, Schwartzmann G, Ohlweiler L, Roesler R, Renck LB, *et al.*: A Placebo-Controlled Crossover Trial of Gastrin-Releasing Peptide in Childhood Autism. *Clin Neuropharmacol* 2017;40:108–112.
 - 21 Verkhatsky A, Rodríguez JJ, Parpura V: Neuroglia in ageing and disease. *Cell Tissue Res* 2014;357:493–503.
 - 22 Careaga M, Van de Water J, Ashwood P: Immune dysfunction in autism: a pathway to treatment. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 2010;7:283–292.
 - 23 McDougle CJ, Landino SM, Vahabzadeh A, O'Rourke J, Zurcher NR, Finger BC, *et al.*: Toward an immune-mediated subtype of autism spectrum disorder. *Brain Res* 2015;1617:72–92.
 - 24 Chez MG, Guido-Estrada N: Immune therapy in autism: historical experience and future directions with immunomodulatory therapy. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 2010;7:293–301.
 - 25 Masi A, Quintana DS, Glozier N, Lloyd AR, Hickie IB, Guastella AJ: Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2015;20:440–446.
 - 26 Gładysz D, Krzywdzińska A, Hozyasz KK: Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder-Could They Hold Promise for Causative Treatment? *Mol Neurobiol* 2018; DOI: 10.1007/s12035-017-0822-x
 - 27 Stubbs EG: Autistic children exhibit undetectable hemagglutination-inhibition antibody titers despite previous rubella vaccination. *J Autism Child Schizophr* 1976;6:269–274.
 - 28 Yang C-J, Liu C-L, Sang B, Zhu X-M, Du Y-J: The combined role of serotonin and

- interleukin-6 as biomarker for autism. *Neuroscience* 2015;284:290–296.
- 29 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J: Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun* 2011;25:40–5.
 - 30 Jyonouchi H, Geng L, Ruby A, Zimmerman-Bier B: Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. *Neuropsychobiology* 2005;51:77–85.
 - 31 Jyonouchi H, Geng L, Davidow AL: Cytokine profiles by peripheral blood monocytes are associated with changes in behavioral symptoms following immune insults in a subset of ASD subjects: an inflammatory subtype? *J Neuroinflammation* 2014;11:187.
 - 32 El-Ansary A, Hassan WM, Qasem H, Das UN: Identification of Biomarkers of Impaired Sensory Profiles among Autistic Patients. *PLoS One* 2016;11:e0164153.
 - 33 Ferguson BJ, Marler S, Altstein LL, Lee EB, Mazurek MO, McLaughlin A, *et al.*: Associations between cytokines, endocrine stress response, and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder. *Brain Behav Immun* 2016;58:57–62.
 - 34 Careaga M, Rogers S, Hansen RL, Amaral DG, Van de Water J, Ashwood P: Immune Endophenotypes in Children With Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry* 2017;81:434–441.
 - 35 Al-Ayadhi LY: Pro-inflammatory cytokines in autistic children in central Saudi Arabia. *Neurosciences (Riyadh)* 2005;10:155–158.
 - 36 Ricci S, Businaro R, Ippoliti F, Vasco VR Lo, Massoni F, Onofri E, *et al.*: Altered Cytokine and BDNF Levels in Autism Spectrum Disorder. *Neurotox Res* 2013;24:491–501.
 - 37 Makinodan M, Iwata K, Ikawa D, Yamashita Y, Yamamuro K, Toritsuka M, *et al.*: Tumor necrosis factor- α expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with early childhood social interaction in autism spectrum disorder. *Neurochem Int* 2017;104:1–5.
 - 38 Han YMY, Cheung WKY, Wong CK, Sze SL, Cheng TWS, Yeung MK, *et al.*: Distinct Cytokine and Chemokine Profiles in Autism Spectrum Disorders. *Front Immunol* 2017;8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00011
 - 39 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J: Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 2011;232:196–199.
 - 40 Ashwood P, Enstrom A, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen RL, Croen LA, *et al.*: Decreased transforming growth factor β 1 in autism: a potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. *J Neuroimmunol* 2008;204:149–153.
 - 41 El Gohary TM, El Aziz NA, Darweesh M, Sadaa ES: Plasma level of transforming growth factor β 1 in children with autism spectrum disorder. *Egypt J Ear, Nose, Throat Allied Sci* 2015;16:69–73.
 - 42 AL-Ayadhi LY, Mostafa GA: Elevated serum levels of macrophage-derived chemokine and thymus and activation-regulated chemokine in autistic children. *J Neuroinflammation* 2013;10:846.
 - 43 Al-Ayadhi LY, Mostafa GA: Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *J Neuroinflammation* 2012;9:158.

- 44 Enstrom A, Onore C, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Croen L, Van de Water J, *et al.*: Detection of IL-17 and IL-23 in Plasma Samples of Children with Autism. *Am J Biochem Biotechnol* 2008;4:114–120.
- 45 Rose D, Van de Water J, Ashwood P: Abstract # 1787 Unique immune profiles in children with autism who experience gastrointestinal co-morbidity. *Brain Behav Immun* 2016;57:e23–e24.
- 46 Napolioni V, Ober-Reynolds B, Szeling S, Corneveaux JJ, Pawlowski T, Ober-Reynolds S, *et al.*: Plasma cytokine profiling in sibling pairs discordant for autism spectrum disorder. *J Neuroinflammation* 2013;10:38.
- 47 Heuer L, Ashwood P, Schauer J, Goines P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, *et al.*: Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res* 2008;1:275–283.
- 48 Hollander E, DelGiudice-Asch G, Simon L, Schmeidler J, Cartwright C, DeCaria CM, *et al.*: B Lymphocyte Antigen D8/17 and Repetitive Behaviors in Autism. *Am J Psychiatry* 1999;156:317–320.
- 49 Mostafa GA, Al-Ayadhi LY: The relationship between the increased frequency of serum antineuronal antibodies and the severity of autism in children. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc* 2012;16:464–468.
- 50 Goines P, Haapanen L, Boyce R, Duncanson P, Braunschweig D, Delwiche L, *et al.*: Autoantibodies to cerebellum in children with autism associate with behavior. *Brain Behav Immun* 2011;25:514–523.
- 51 Piras IS, Haapanen L, Napolioni V, Sacco R, Van de Water J, Persico AM: Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav Immun* 2014;38:91–99.
- 52 Mostafa GA, Al-Ayadhi LY: Increased serum levels of anti-ganglioside M1 auto-antibodies in autistic children: relation to the disease severity. *J Neuroinflammation* 2011;8:39.
- 53 Braunschweig D, Duncanson P, Boyce R, Hansen R, Ashwood P, Pessah IN, *et al.*: Behavioral Correlates of Maternal Antibody Status Among Children with Autism. *J Autism Dev Disord* 2012;42:1435–1445.
- 54 Lacivita E, Perrone R, Margari L, Leopoldo M: Targets for Drug Therapy for Autism Spectrum Disorder: Challenges and Future Directions. *J Med Chem* 2017;60:9114–9141.
- 55 Estes ML, McAllister AK: Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 2015;16:469–486.
- 56 Meltzer A, Van de Water J: The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2017;42:284–298.
- 57 Tarozzi A, Angeloni C, Malaguti M, Morroni F, Hrelia S, Hrelia P: Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:415078.
- 58 Juge N, Mithen RF, Traka M: Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol life Sci C* 2007;64:1105–1127.
- 59 Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahey JW, Talalay P, *et al.*: Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:15550–15555.
- 60 Lynch R, Diggins EL, Connors SL, Zimmerman AW, Singh K, Liu H, *et al.*: Sulforaphane

- from Broccoli Reduces Symptoms of Autism: A Follow-up Case Series from a Randomized Double-blind Study. *Glob Adv Heal Med* 2017;6:2164957X17735826.
- 61 Sareddy GR, Geeviman K, Ramulu C, Babu PP: The nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib suppresses the growth and induces apoptosis of human glioblastoma cells via the NF- κ B pathway. *J Neurooncol* 2012;106:99–109.
- 62 Arias-Negrete S, Keller K, Chadee K: Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:582–589.
- 63 Asadabadi M, Mohammadi M-R, Ghanizadeh A, Modabbernia A, Ashrafi M, Hassanzadeh E, *et al.*: Celecoxib as adjunctive treatment to risperidone in children with autistic disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)* 2013;225:51–59.
- 64 Pulte ED, Dmytrijuk A, Nie L, Goldberg KB, McKee AE, Farrell AT, *et al.*: FDA Approval Summary: Lenalidomide as Maintenance Therapy After Autologous Stem Cell Transplant in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Oncologist* 2018; DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0440
- 65 Chez M, Low R, Parise C, Donnel T: Safety and observations in a pilot study of lenalidomide for treatment in autism. *Autism Res Treat* 2012;2012:291601.
- 66 Kreth S, Ledderose C, Luchting B, Weis F, Thiel M: Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways. *Shock* 2010;34:10–16.
- 67 Dolatabadi HRD, Zarrindast MR, Reisi P, Nasehi M: The Effects of Pentoxifylline on Serum Levels of Interleukin 10 and Interferon Gamma and Memory Function in Lipopolysaccharide-induced Inflammation in Rats. *Adv Biomed Res* 2017;6:110.
- 68 Gupta S, Rimland B, Shilling PD: Pentoxifylline: brief review and rationale for its possible use in the treatment of autism. *J Child Neurol* 1996;11:501–504.
- 69 Gupta S: Immunological treatments for autism. *J Autism Dev Disord* 2000;30:475–479.
- 70 Sogame S: Clinical experiences with the administration of pentoxifylline against autism and behavior abnormalities. *Jpn J Child Psych* 1978;137–144.
- 71 Nakane A: Effect of pentoxifylline in autistic children. *Tokyo Eisei Gakkashi* 1980;104–105.
- 72 Shimoide M: Effect of pentoxifylline (Trental) on infantile autism. *Clin Exp Med* 1981;285–288.
- 73 Turek S: Treatment of psychotic and autistic children with pentoxifylline. *ASANA* 1981;51–60.
- 74 Suzuki M, Nakashita Y, Ogawa T, Sugiyama A, *et al.*: On the effects of pentoxifylline upon the EEG activity of early infantile autism. *Brain Dev* 1984;156.
- 75 Akhondzadeh S, Fallah J, Mohammadi M-R, Imani R, Mohammadi M, Salehi B, *et al.*: Double-blind placebo-controlled trial of pentoxifylline added to risperidone: effects on aberrant behavior in children with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:32–36.
- 76 Pérez JCJ, Ramírez AC, González LT, Espinosa LEM, Quintana MMP, Galván GA, *et al.*: Spironolactone Effect in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:3196431.
- 77 Miura R, Nakamura K, Miura D, Miura A, Hisamatsu K, Kajiya M, *et al.*: Anti-

- inflammatory effect of spironolactone on human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Sci* 2006;101:256–259.
- 78 Miura R, Nakamura K, Miura D, Miura A, Hisamatsu K, Kajiya M, *et al.*: Aldosterone synthesis and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Sci* 2006;102:288–295.
- 79 Bendtzen K, Hansen PR, Rieneck K: Spironolactone inhibits production of proinflammatory cytokines, including tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma, and has potential in the treatment of arthritis. *Clin Exp Immunol* 2003;134:151–158.
- 80 Kato Y, Kamiya H, Koide N, Odkhuu E, Komatsu T, Dagvadorj J, *et al.*: Spironolactone inhibits production of proinflammatory mediators in response to lipopolysaccharide via inactivation of nuclear factor- κ B. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2014;36:237–241.
- 81 Bradstreet JJ, Smith S, Granpeesheh D, El-Dahr JM, Rossignol D: Spironolactone might be a desirable immunologic and hormonal intervention in autism spectrum disorders. *Med Hypotheses* 2007;68:979–987.
- 82 Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673–751.
- 83 López-Lázaro M: Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:31–59.
- 84 Kempuraj D, Madhappan B, Christodoulou S, Boucher W, Cao J, Papadopoulou N, *et al.*: Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. *Br J Pharmacol* 2005;145:934–944.
- 85 Theoharides TC, Asadi S, Panagiotidou S: A case series of a luteolin formulation (NeuroProtek®) in children with autism spectrum disorders. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012;25:317–323.
- 86 Taliou A, Zintzaras E, Lykouras L, Francis K: An open-label pilot study of a formulation containing the anti-inflammatory flavonoid luteolin and its effects on behavior in children with autism spectrum disorders. *Clin Ther* 2013;35:592–602.
- 87 Tsilioni I, Taliou A, Francis K, Theoharides TC: Children with autism spectrum disorders, who improved with a luteolin-containing dietary formulation, show reduced serum levels of TNF and IL-6. *Transl Psychiatry* 2015;5:e647.
- 88 Bertolino B, Crupi R, Impellizzeri D, Bruschetta G, Cordaro M, Siracusa R, *et al.*: Beneficial Effects of Co-Ultramicronized Palmitoylethanolamide/Luteolin in a Mouse Model of Autism and in a Case Report of Autism. *CNS Neurosci Ther* 2017;23:87–98.
- 89 Schweingruber N, Reichardt SD, Lühder F, Reichardt HM: Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. *J Neuroendocrinol* 2012;24:174–182.
- 90 Duffy FH, Shankardass A, McAnulty GB, Eksioglu YZ, Coulter D, Rotenberg A, *et al.*: Corticosteroid therapy in regressive autism: a retrospective study of effects on the Frequency Modulated Auditory Evoked Response (FMAER), language, and behavior. *BMC Neurol* 2014;14:70.
- 91 Shenoy S, Arnold S, Chatila T: Response to steroid therapy in autism secondary to autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Pediatr* 2000;136:682–687.
- 92 Stefanatos GA, Grover W, Geller E: Case study: corticosteroid treatment of language

- regression in pervasive developmental disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1995;34:1107–1111.
- 93 Mordekar SR, Prendergast M, Chattopadhyay AK, Baxter PS: Corticosteroid treatment of behaviour, language and motor regression in childhood disintegrative disorder. *Eur J Paediatr Neurol EJPJ Off J Eur Paediatr Neurol Soc* 2009;13:367–369.
 - 94 Buitelaar JK, Dekker ME, van Ree JM, van Engeland H: A controlled trial with ORG 2766, an ACTH-(4-9) analog, in 50 relatively able children with autism. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol* 1996;6:13–19.
 - 95 Buitelaar JK, van Engeland H, de Kogel K, de Vries H, van Hooff J, van Ree J: The adrenocorticotrophic hormone (4-9) analog ORG 2766 benefits autistic children: report on a second controlled clinical trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1992;31:1149–1156.
 - 96 Buitelaar JK, van Engeland H, de Kogel KH, de Vries H, van Hooff JA, van Ree JM: The use of adrenocorticotrophic hormone (4-9) analog ORG 2766 in autistic children: effects on the organization of behavior. *Biol Psychiatry* 1992;31:1119–1129.
 - 97 Buitelaar JK, van Engeland H, van Ree JM, de Wied D: Behavioral effects of Org 2766, a synthetic analog of the adrenocorticotrophic hormone (4-9), in 14 outpatient autistic children. *J Autism Dev Disord* 1990;20:467–478.
 - 98 Verbaten MN, Kemner C, Buitelaar JK, van Ree JM, van Beijsterveld CE, van Engeland H: Effects of ORG-2766 on brain event-related potentials of autistic children. *Psychiatry Res* 1996;63:33–45.
 - 99 Fung LK, Libove RA, Phillips J, Haddad F, Hardan AY: Brief report: an open-label study of the neurosteroid pregnenolone in adults with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 2014;44:2971–2977.
 - 100 Marx CE, Keefe RSE, Buchanan RW, Hamer RM, Kilts JD, Bradford DW, *et al.*: Proof-of-concept trial with the neurosteroid pregnenolone targeting cognitive and negative symptoms in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2009;34:1885–1903.
 - 101 Jasion VS, Burnett BP: Survival and digestibility of orally-administered immunoglobulin preparations containing IgG through the gastrointestinal tract in humans. *Nutr J* 2015;14:22.
 - 102 Schneider CK, Melmed RD, Barstow LE, Enriquez FJ, Ranger-Moore J, Ostrem JA: Oral human immunoglobulin for children with autism and gastrointestinal dysfunction: a prospective, open-label study. *J Autism Dev Disord* 2006;36:1053–1064.
 - 103 Handen BL, Melmed RD, Hansen RL, Aman MG, Burnham DL, Bruss JB, *et al.*: A double-blind, placebo-controlled trial of oral human immunoglobulin for gastrointestinal dysfunction in children with autistic disorder. *J Autism Dev Disord* 2009;39:796–805.
 - 104 Rütter A, Luger TA: High-dose intravenous immunoglobulins: an approach to treat severe immune-mediated and autoimmune diseases of the skin. *J Am Acad Dermatol* 2001;44:1010–1024.
 - 105 Niederhofer H, Staffen W, Mair A: Immunoglobulins as an alternative strategy of psychopharmacological treatment of children with autistic disorder. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2003;28:1014–1015.
 - 106 DelGiudice-Asch G, Simon L, Schmeidler J, Cunningham-Rundles C, Hollander E: Brief report: a pilot open clinical trial of intravenous immunoglobulin in childhood autism. *J Autism Dev Disord* 1999;29:157–160.

- 107 Plioplys A V.: Intravenous immunoglobulin treatment of children with autism. *J Child Neurol* 1998;13:79–82.
- 108 Melamed IR, Heffron M, Testori A, Lipe K: A pilot study of high-dose intravenous immunoglobulin 5% for autism: Impact on autism spectrum and markers of neuroinflammation. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res* 2018; DOI: 10.1002/aur.1906
- 109 Siniscalco D, Bradstreet JJ, Antonucci N: Therapeutic role of hematopoietic stem cells in autism spectrum disorder-related inflammation. *Front Immunol* 2013;4:140.
- 110 Lv Y-T, Zhang Y, Liu M, Qiuwaxi J, Ashwood P, Cho SC, *et al.*: Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. *J Transl Med* 2013;11:196.
- 111 Bradstreet JJ, Sych N, Antonucci N, Klunnik M, Ivankova O, Matyashchuk I, *et al.*: Efficacy of fetal stem cell transplantation in autism spectrum disorders: an open-labeled pilot study. *Cell Transplant* 2014;23 Suppl 1:S105-112.
- 112 Sharma A, Badhe P, N, Gokulch I, ran, Kulkarni P, *et al.*: An Improved Case of Autism as Revealed by PET CT Scan in Patient Transplanted with Autologous Bone Marrow Derived Mononuclear Cells. *J Stem Cell Res Ther* 2013;3. DOI: 10.4172/2157-7633.1000139
- 113 Sharma A, Gokulchandran N, Sane H, Nagrajan A, Paranjape A, Kulkarni P, *et al.*: Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for autism: an open label proof of concept study. *Stem Cells Int* 2013;2013:623875.
- 114 Bansal H, Verma P, Agrawal A, Leon J, Sundell IB, Koka PS: A Short Study Report on Bone Marrow Aspirate Concentrate Cell Therapy in Ten South Asian Indian Patients with Autism. *J Stem Cells* 2016;11:25–36.
- 115 Dawson G, Sun JM, Davlantis KS, Murias M, Franz L, Troy J, *et al.*: Autologous Cord Blood Infusions Are Safe and Feasible in Young Children with Autism Spectrum Disorder: Results of a Single-Center Phase I Open-Label Trial. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:1332–1339.
- 116 Shroff G: Human Embryonic Stem Cells in the Treatment of Autism: A Case Series. *Innov Clin Neurosci* 2017;14:12–16.
- 117 Arnaudov A, Kostova Z: Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2015;29:1017–1023.
- 118 Fudenberg HH: Dialysable lymphocyte extract (DLyE) in infantile onset autism: a pilot study. *Biotherapy* 1996;9:143–147.
- 119 Soczynska JK, Mansur RB, Brietzke E, Swardfager W, Kennedy SH, Woldeyohannes HO, *et al.*: Novel therapeutic targets in depression: minocycline as a candidate treatment. *Behav Brain Res* 2012;235:302–317.
- 120 Rosenblat JD, McIntyre RS: Efficacy and tolerability of minocycline for depression: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Affect Disord* 2018;227:219–225.
- 121 Kim H-S, Suh Y-H: Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res* 2009;196:168–179.
- 122 Orsucci D, Calsolaro V, Mancuso M, Siciliano G: Neuroprotective effects of tetracyclines: molecular targets, animal models and human disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009;8:222–231.
- 123 Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM: The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* 2004;3:744–751.

- 124 Paribello C, Tao L, Folino A, Berry-Kravis E, Tranfaglia M, Ethell IM, *et al.*: Open-label add-on treatment trial of minocycline in fragile X syndrome. *BMC Neurol* 2010;10:91.
- 125 Leigh MJS, Nguyen D V., Mu Y, Winarni TI, Schneider A, Chechi T, *et al.*: A randomized double-blind, placebo-controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. *J Dev Behav Pediatr JDBP* 2013;34:147–155.
- 126 Pardo CA, Buckley A, Thurm A, Lee L-C, Azhagiri A, Neville DM, *et al.*: A pilot open-label trial of minocycline in patients with autism and regressive features. *J Neurodev Disord* 2013;5:9.
- 127 Ghaleiha A, Alikhani R, Kazemi M-R, Mohammadi M-R, Mohammadinejad P, Zeinoddini A, *et al.*: Minocycline as Adjunctive Treatment to Risperidone in Children with Autistic Disorder: A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2016;26:784–791.
- 128 Derosa G, Sahebkar A, Maffioli P: The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. *J Cell Physiol* 2018;233:153–161.
- 129 Yandrapalli S, Aronow WS: Cardiovascular benefits of the newer medications for treating type 2 diabetes mellitus. *J Thorac Dis* 2017;9:2124–2134.
- 130 Yessoufou A, Wahli W: Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly* 2010;140:w13071.
- 131 Rogliani P, Ora J, Di Daniele N, Lauro D: Pleiotropic effects of hypoglycemic agents: implications in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol* 2018;40:34–38.
- 132 Nierenberg AA, Ghaznavi SA, Sande Mathias I, Ellard KK, Janos JA, Sylvia LG: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 Alpha as a Novel Target for Bipolar Disorder and Other Neuropsychiatric Disorders. *Biol Psychiatry* 2018; DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.12.014
- 133 Boris M, Kaiser CC, Goldblatt A, Elice MW, Edelson SM, Adams JB, *et al.*: Effect of pioglitazone treatment on behavioral symptoms in autistic children. *J Neuroinflammation* 2007;4:3.
- 134 Ghaleiha A, Rasa SM, Nikoo M, Farokhnia M, Mohammadi M-R, Akhondzadeh S: A pilot double-blind placebo-controlled trial of pioglitazone as adjunctive treatment to risperidone: Effects on aberrant behavior in children with autism. *Psychiatry Res* 2015;229:181–187.
- 135 McCracken JT, McGough J, Shah B, Cronin P, Hong D, Aman MG, *et al.*: Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. *N Engl J Med* 2002;347:314–321.
- 136 Noto C, Ota VK, Gouvea ES, Rizzo LB, Spindola LMN, Honda PHS, *et al.*: Effects of Risperidone on Cytokine Profile in Drug-Naïve First-Episode Psychosis. *Int J Neuropsychopharmacol* 2015;18. DOI: 10.1093/ijnp/pyu042
- 137 Baumeister D, Ciufolini S, Mondelli V: Effects of psychotropic drugs on inflammation: consequence or mediator of therapeutic effects in psychiatric treatment? *Psychopharmacology (Berl)* 2016;233:1575–1589.
- 138 MacDowell KS, García-Bueno B, Madrigal JLM, Parellada M, Arango C, Micó JA, *et al.*: Risperidone normalizes increased inflammatory parameters and restores anti-inflammatory pathways in a model of neuroinflammation. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16:121–135.
- 139 Choi JE, Widjaja F, Careaga M, Bent S, Ashwood P, Hendren RL: Change in plasma cytokine levels during risperidone treatment in children with autism. *J Child Adolesc*

- Psychopharmacol 2014;24:586–589.
- 140 Tobiasova Z, van der Lingen KHB, Scahill L, Leckman JF, Zhang Y, Chae W, *et al.*: Risperidone-related improvement of irritability in children with autism is not associated with changes in serum of epidermal growth factor and interleukin-13. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2011;21:555–564.
 - 141 Mostafa GA, AL-Ayadhi LY: Reduced serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D in children with autism: Relation to autoimmunity. *J Neuroinflammation* 2012;9:201.
 - 142 Saad K, Abdel-Rahman AA, Elserogy YM, Al-Atram AA, Cannell JJ, Bjørklund G, *et al.*: Vitamin D status in autism spectrum disorders and the efficacy of vitamin D supplementation in autistic children. *Nutr Neurosci* 2016;19:346–351.
 - 143 Meguid NA, Hashish AF, Anwar M, Sidhom G: Reduced serum levels of 25-hydroxy and 1,25-dihydroxy vitamin D in Egyptian children with autism. *J Altern Complement Med* 2010;16:641–645.
 - 144 Tostes MHF de S, Polonini HC, Gattaz WF, Raposo NRB, Baptista EB: Low serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) in children with autism. *Trends Psychiatry Psychother* 2012;34:161–163.
 - 145 Kočovská E, Andorsdóttir G, Weihe P, Halling J, Fernell E, Stóra T, *et al.*: Vitamin d in the general population of young adults with autism in the faroe islands. *J Autism Dev Disord* 2014;44:2996–3005.
 - 146 Cannell JJ: Autism, will vitamin D treat core symptoms? *Med Hypotheses* 2013;81:195–198.
 - 147 Jia F, Wang B, Shan L, Xu Z, Staal WG, Du L: Core symptoms of autism improved after vitamin D supplementation. *Pediatrics* 2015;135:e196-198.
 - 148 Feng J, Shan L, Du L, Wang B, Li H, Wang W, *et al.*: Clinical improvement following vitamin D3 supplementation in Autism Spectrum Disorder. *Nutr Neurosci* 2017;20:284–290.
 - 149 Kerley CP, Power C, Gallagher L, Coghlan D: Lack of effect of vitamin D3 supplementation in autism: a 20-week, placebo-controlled RCT. *Arch Dis Child* 2017;102:1030–1036.
 - 150 Saad K, Abdel-Rahman AA, Elserogy YM, Al-Atram AA, El-Houfey AA, Othman HA-K, *et al.*: Randomized controlled trial of vitamin D supplementation in children with autism spectrum disorder. *J Child Psychol Psychiatry* 2018;59:20–29.
 - 151 Mazahery H, Stonehouse W, Delshad M, Kruger MC, Conlon CA, Beck KL, *et al.*: Relationship between Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control and Randomised Controlled Trials. *Nutrients* 2017;9. DOI: 10.3390/nu9020155
 - 152 Layé S, Nadjar A, Joffre C, Bazinet RP: Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology. *Pharmacol Rev* 2018;70:12–38.
 - 153 Madore C, Leyrolle Q, Lacabanne C, Benmamar-Badel A, Joffre C, Nadjar A, *et al.*: Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3, and Microbiota. *Neural Plast* 2016;2016:3597209.
 - 154 SaLam M, Motaleb F, Ahmed M, Mahmoud A: Anti-inflammatory effect of Omega-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma; relation to nuclear factor-kappa B (NF-κB) and inflammatory cytokines il-12 and il-13. *Egypt J Biochem Mol Biol*

- 2010;28. DOI: 10.4314/ejbmb.v28i2.60793
- 155 Zhang R, He G, Wang Y, Zhou K, Ma E: Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the increase in cytokines and chemotactic factors induced in vitro by lymph fluid from an intestinal ischemia-reperfusion injury model. *Nutrition* 2015;31:508–514.
- 156 Farjadian S, Moghtaderi M, Kalani M, Gholami T, Hosseini Teshnizi S: Effects of omega-3 fatty acids on serum levels of T-helper cytokines in children with asthma. *Cytokine* 2016;85:61–66.
- 157 Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH: Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J Am Coll Nutr* 2004;23:71–78.
- 158 Allam-Ndoul B, Guénard F, Barbier O, Vohl M-C: Effect of n-3 fatty acids on the expression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. *Lipids Health Dis* 2016;15:69.
- 159 Posar A, Visconti P: Omega-3 supplementation in autism spectrum disorders: A still open question? *J Pediatr Neurosci* 2016;11:225–227.
- 160 Posar A, Visconti P: Complementary and Alternative Medicine in Autism: The Question of Omega-3. *Pediatr Ann* 2016;45:e103-107.
- 161 Sathe N, Andrews JC, McPheeters ML, Warren ZE: Nutritional and Dietary Interventions for Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Pediatrics* 2017;139:e20170346.
- 162 Horvath A, Łukasik J, Szajewska H: ω-3 Fatty Acid Supplementation Does Not Affect Autism Spectrum Disorder in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Nutr* 2017;147:367–376.
- 163 Li Y-J, Li Y-M, Xiang D-X: Supplement intervention associated with nutritional deficiencies in autism spectrum disorders: a systematic review. *Eur J Nutr* 2017; DOI: 10.1007/s00394-017-1528-6
- 164 Cheng Y-S, Tseng P-T, Chen Y-W, Stubbs B, Yang W-C, Chen T-Y, *et al.*: Supplementation of omega 3 fatty acids may improve hyperactivity, lethargy, and stereotypy in children with autism spectrum disorders: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2017;13:2531–2543.
- 165 MacLennan KM, Darlington CL, Smith PF: The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Prog Neurobiol* 2002;67:235–257.
- 166 Ernst E: The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: Ginkgo, St. John's Wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. *Ann Intern Med* 2002;136:42–53.
- 167 Niederhofer H: First preliminary results of an observation of Ginkgo Biloba treating patients with autistic disorder. *Phyther Res PTR* 2009;23:1645–1646.
- 168 Hasanzadeh E, Mohammadi M-R, Ghanizadeh A, Rezazadeh S-A, Tabrizi M, Rezaei F, *et al.*: A double-blind placebo controlled trial of Ginkgo biloba added to risperidone in patients with autistic disorders. *Child Psychiatry Hum Dev* 2012;43:674–682.
- 169 Prokopieva VD, Yarygina EG, Bokhan NA, Ivanova SA: Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016. DOI: 10.1155/2016/2939087
- 170 Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Matejovicova M, Tkac I, Boldyrev AA: Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cell Mol Neurobiol* 1999;19:45–56.
- 171 Wang AM, Ma C, Xie ZH, Shen F: Use of carnosine as a natural anti-senescence drug for

- human beings. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65:869–871.
- 172 Fleisher-Berkovich S, Abramovitch-Dahan C, Ben-Shabat S, Apte R, Beit-Yannai E: Inhibitory effect of carnosine and N-acetyl carnosine on LPS-induced microglial oxidative stress and inflammation. *Peptides* 2009;30:1306–1312.
- 173 Hajizadeh-Zaker R, Ghajar A, Mesgarpour B, Afarideh M, Mohammadi M-R, Akhondzadeh S: l-Carnosine As an Adjunctive Therapy to Risperidone in Children with Autistic Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2018;28:74–81.
- 174 Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, Becker M, Schaefer K, Black C, *et al.*: Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J Child Neurol* 2002;17:833–837.
- 175 Mehrzad-Saber Z, Kheirouri S, Noorazar S-G: Effects of L- Carnosine Supplementation on Sleep Disorders and Disease Severity in Autistic Children: A Randomized, Controlled Clinical Trial. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018; DOI: 10.1111/bcpt.12979
- 176 Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA: N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:355–359.
- 177 Deepmala null, Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, *et al.*: Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 2015;55:294–321.
- 178 Pinar Karapinar S, Ulum YZA, Ozcelik B, Dogan Buzoglu H, Ceyhan D, Balci Peynircioglu B, *et al.*: The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol* 2016;68:48–54.
- 179 Palacio JR, Markert UR, Martínez P: Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc . [et al]* 2011;60:695–704.
- 180 Marler S, Sanders KB, Veenstra-VanderWeele J: N-acetylcysteine as treatment for self-injurious behavior in a child with autism. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2014;24:231–234.
- 181 Stutzman D, Dopheide J: Acetylcysteine for treatment of autism spectrum disorder symptoms. *Am J Heal Pharm AJHP Off J Am Soc Heal Pharm* 2015;72:1956–1959.
- 182 Ghanizadeh A, Derakhshan N: N-acetylcysteine for treatment of autism, a case report. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci* 2012;17:985–987.
- 183 Hardan AY, Fung LK, Libove RA, Obukhanych T V., Nair S, Herzenberg LA, *et al.*: A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. *Biol Psychiatry* 2012;71:956–961.
- 184 Ghanizadeh A, Moghimi-Sarani E: A randomized double blind placebo controlled clinical trial of N-Acetylcysteine added to risperidone for treating autistic disorders. *BMC Psychiatry* 2013;13:196.
- 185 Nikoo M, Radnia H, Farokhnia M, Mohammadi M-R, Akhondzadeh S: N-acetylcysteine as an adjunctive therapy to risperidone for treatment of irritability in autism: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of efficacy and safety. *Clin Neuropharmacol* 2015;38:11–17.
- 186 Wink LK, Adams R, Wang Z, Klaunig JE, Plawecki MH, Posey DJ, *et al.*: A randomized placebo-controlled pilot study of N-acetylcysteine in youth with autism spectrum disorder.

- Mol Autism 2016;7:26.
- 187 Dean OM, Gray KM, Villagonzalo K-A, Dodd S, Mohebbi M, Vick T, *et al.*: A randomised, double blind, placebo-controlled trial of a fixed dose of N-acetyl cysteine in children with autistic disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 2017;51:241–249.
- 188 Li Q, Zhou J-M: The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience* 2016;324:131–139.
- 189 Doenyas C: Gut Microbiota, Inflammation, and Probiotics on Neural Development in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience* 2018; DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.060
- 190 Yang Y, Tian J, Yang B: Targeting gut microbiome: A novel and potential therapy for autism. *Life Sci* 2018;194:111–119.
- 191 Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Väisänen ML, *et al.*: Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol* 2000;15:429–435.
- 192 Kałużna-Czaplińska J, Błaszczuk S: The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. *Nutrition* 2012;28:124–126.
- 193 Kang D-W, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, *et al.*: Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* 2017;5:10.
- 194 Pärty A, Kalliomäki M, Wacklin P, Salminen S, Isolauri E: A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. *Pediatr Res* 2015;77:823–828.
- 195 Seki Y, Kato TA, Monji A, Mizoguchi Y, Horikawa H, Sato-Kasai M, *et al.*: Pretreatment of aripiprazole and minocycline, but not haloperidol, suppresses oligodendrocyte damage from interferon- γ -stimulated microglia in co-culture model. *Schizophr Res* 2013;151:20–28.
- 196 Sobiś J, Rykaczewska-Czerwińska M, Świętochowska E, Gorczyca P: Therapeutic effect of aripiprazole in chronic schizophrenia is accompanied by anti-inflammatory activity. *Pharmacol Reports* 2015;67:353–359.
- 197 Leng Y, Chuang D-M: Endogenous alpha-synuclein is induced by valproic acid through histone deacetylase inhibition and participates in neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2006;26:7502–7512.
- 198 Song R, Yu D, Yoon J, Park J: Valproic acid attenuates the expression of pro-inflammatory cytokines lipopolysaccharide-treated canine peripheral blood mononuclear cells (in vitro) and in a canine endotoxemia model (in vivo). *Vet Immunol Immunopathol* 2015;166:132–137.
- 199 Suda S, Katsura K, Kanamaru T, Saito M, Katayama Y: Valproic acid attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat brain through inhibition of oxidative stress and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2013;707:26–31.
- 200 Ximenes JCM, de Oliveira Gonçalves D, Siqueira RMP, Neves KRT, Santos Cerqueira G, Correia AO, *et al.*: Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2013;386:575–587.
- 201 Chugani DC, Chugani HT, Wiznitzer M, Parikh S, Evans PA, Hansen RL, *et al.*: Efficacy of Low-Dose Bupirone for Restricted and Repetitive Behavior in Young Children with

- Autism Spectrum Disorder: A Randomized Trial. *J Pediatr* 2016;170:45-53.e1-4.
- 202 Ghanizadeh A, Ayoobzadehshirazi A: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial of adjuvant buspirone for irritability in autism. *Pediatr Neurol* 2015;52:77-81.
- 203 McCormick LH: Treatment with buspirone in a patient with autism. *Arch Fam Med* 1997;6:368-370.
- 204 Chantiluke K, Barrett N, Giampietro V, Brammer M, Simmons A, Rubia K: Disorder-dissociated effects of fluoxetine on brain function of working memory in attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Psychol Med* 2015;45:1195-1205.
- 205 Hollander E, Soorya L, Chaplin W, Anagnostou E, Taylor BP, Ferretti CJ, *et al.*: A double-blind placebo-controlled trial of fluoxetine for repetitive behaviors and global severity in adult autism spectrum disorders. *Am J Psychiatry* 2012;169:292-299.
- 206 Hollander E, Phillips A, Chaplin W, Zagursky K, Novotny S, Wasserman S, *et al.*: A placebo controlled crossover trial of liquid fluoxetine on repetitive behaviors in childhood and adolescent autism. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 2005;30:582-589.
- 207 Alcamí Pertejo M, Peral Guerra M, Gilaberte I: [Open study of fluoxetine in children with autism]. *Actas Esp Psiquiatr* 2000;28:353-356.
- 208 Fatemi SH, Realmuto GM, Khan L, Thuras P: Fluoxetine in treatment of adolescent patients with autism: a longitudinal open trial. *J Autism Dev Disord* 1998;28:303-307.
- 209 Owley T, Brune CW, Salt J, Walton L, Guter S, Ayuyao N, *et al.*: A pharmacogenetic study of escitalopram in autism spectrum disorders. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res* 2010;3:1-7.
- 210 Owley T, Walton L, Salt J, Guter SJ, Winnega M, Leventhal BL, *et al.*: An open-label trial of escitalopram in pervasive developmental disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2005;44:343-348.
- 211 King BH, Hollander E, Sikich L, McCracken JT, Scahill L, Bregman JD, *et al.*: Lack of efficacy of citalopram in children with autism spectrum disorders and high levels of repetitive behavior: citalopram ineffective in children with autism. *Arch Gen Psychiatry* 2009;66:583-590.
- 212 Hellings JA, Kelley LA, Gabrielli WF, Kilgore E, Shah P: Sertraline response in adults with mental retardation and autistic disorder. *J Clin Psychiatry* 1996;57:333-336.
- 213 McDougle CJ, Brodtkin ES, Naylor ST, Carlson DC, Cohen DJ, Price LH: Sertraline in adults with pervasive developmental disorders: a prospective open-label investigation. *J Clin Psychopharmacol* 1998;18:62-66.
- 214 Steingard RJ, Zimnitzky B, DeMaso DR, Bauman ML, Bucci JP: Sertraline treatment of transition-associated anxiety and agitation in children with autistic disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 1997;7:9-15.
- 215 Posey DJ, Kem DL, Swiezy NB, Sweeten TL, Wiegand RE, McDougle CJ: A pilot study of D-cycloserine in subjects with autistic disorder. *Am J Psychiatry* 2004;161:2115-2117.
- 216 Minshawi NF, Wink LK, Shaffer R, Plawecki MH, Posey DJ, Liu H, *et al.*: A randomized, placebo-controlled trial of D-cycloserine for the enhancement of social skills training in autism spectrum disorders. *Mol Autism* 2016;7:2.
- 217 Urbano M, Okwara L, Manser P, Hartmann K, Deutsch SI: A trial of d-cycloserine to treat the social deficit in older adolescents and young adults with autism spectrum disorders. *J*

- Neuropsychiatry Clin Neurosci 2015;27:133–138.
- 218 Urbano M, Okwara L, Manser P, Hartmann K, Herndon A, Deutsch SI: A trial of D-cycloserine to treat stereotypies in older adolescents and young adults with autism spectrum disorder. *Clin Neuropharmacol* 2014;37:69–72.
- 219 King BH, Wright DM, Handen BL, Sikich L, Zimmerman AW, McMahon W, *et al.*: Double-blind, placebo-controlled study of amantadine hydrochloride in the treatment of children with autistic disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2001;40:658–665.
- 220 Owley T, Salt J, Guter S, Grieve A, Walton L, Ayuyao N, *et al.*: A prospective, open-label trial of memantine in the treatment of cognitive, behavioral, and memory dysfunction in pervasive developmental disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2006;16:517–524.
- 221 Chez MG, Burton Q, Dowling T, Chang M, Khanna P, Kramer C: Memantine as adjunctive therapy in children diagnosed with autistic spectrum disorders: an observation of initial clinical response and maintenance tolerability. *J Child Neurol* 2007;22:574–579.
- 222 Joshi G, Wozniak J, Faraone S V., Fried R, Chan J, Furtak S, *et al.*: A Prospective Open-Label Trial of Memantine Hydrochloride for the Treatment of Social Deficits in Intellectually Capable Adults With Autism Spectrum Disorder. *J Clin Psychopharmacol* 2016;36:262–271.
- 223 Williams PG, Allard A, Sears L, Dalrymple N, Bloom AS: Brief report: case reports on naltrexone use in children with autism: controlled observations regarding benefits and practical issues of medication management. *J Autism Dev Disord* 2001;31:103–108.
- 224 Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, van Berckelaer-Onnes IA, van Engeland H: Brief report: six months continuation treatment in naltrexone-responsive children with autism: an open-label case-control design. *J Autism Dev Disord* 1999;29:167–169.
- 225 Campbell M, Anderson LT, Small AM, Adams P, Gonzalez NM, Ernst M: Naltrexone in autistic children: behavioral symptoms and attentional learning. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1993;32:1283–1291.
- 226 Zingarelli G, Ellman G, Hom A, Wymore M, Heidorn S, Chicz-DeMet A: Clinical effects of naltrexone on autistic behavior. *Am J Ment Retard AJMR* 1992;97:57–63.
- 227 Leboyer M, Bouvard MP, Launay JM, Tabuteau F, Waller D, Dugas M, *et al.*: Brief report: a double-blind study of naltrexone in infantile autism. *J Autism Dev Disord* 1992;22:309–319.
- 228 Knabe R, Schulz P, Richard J: Initial aggravation of self-injurious behavior in autistic patients receiving naltrexone treatment. *J Autism Dev Disord* 1990;20:591–593.
- 229 Walters AS, Barrett RP, Feinstein C, Mercurio A, Hole WT: A case report of naltrexone treatment of self-injury and social withdrawal in autism. *J Autism Dev Disord* 1990;20:169–176.
- 230 Campbell M, Anderson LT, Small AM, Locascio JJ, Lynch NS, Choroco MC: Naltrexone in autistic children: a double-blind and placebo-controlled study. *Psychopharmacol Bull* 1990;26:130–135.
- 231 Barrett RP, Feinstein C, Hole WT: Effects of naloxone and naltrexone on self-injury: a double-blind, placebo-controlled analysis. *Am J Ment Retard AJMR* 1989;93:644–651.
- 232 Feldman HM, Kolmen BK, Gonzaga AM: Naltrexone and communication skills in young children with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999;38:587–593.
- 233 Kolmen BK, Feldman HM, Handen BL, Janosky JE: Naltrexone in young autistic children: replication study and learning measures. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*

- 1997;36:1570–1578.
- 234 Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, van Engeland H: The effects of chronic naltrexone treatment in young autistic children: a double-blind placebo-controlled crossover study. *Biol Psychiatry* 1996;39:1023–1031.
- 235 Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, Weijnen FG, van Engeland H: Placebo-controlled acute dosage naltrexone study in young autistic children. *Psychiatry Res* 1995;58:203–215.
- 236 Bouvard MP, Leboyer M, Launay JM, Recasens C, Plumet MH, Waller-Perotte D, *et al.*: Low-dose naltrexone effects on plasma chemistries and clinical symptoms in autism: a double-blind, placebo-controlled study. *Psychiatry Res* 1995;58:191–201.
- 237 Willemsen-Swinkels SH, Buitelaar JK, Nijhof GJ, van Engeland H: Failure of naltrexone hydrochloride to reduce self-injurious and autistic behavior in mentally retarded adults. Double-blind placebo-controlled studies. *Arch Gen Psychiatry* 1995;52:766–773.
- 238 Kolmen BK, Feldman HM, Handen BL, Janosky JE: Naltrexone in young autistic children: a double-blind, placebo-controlled crossover study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1995;34:223–231.
- 239 Gonzalez NM, Campbell M, Small AM, Shay J, Bluhm LD, Adams PB, *et al.*: Naltrexone plasma levels, clinical response and effect on weight in autistic children. *Psychopharmacol Bull* 1994;30:203–208.
- 240 Scifo R, Cioni M, Nicolosi A, Batticane N, Tirolo C, Testa N, *et al.*: Opioid-immune interactions in autism: behavioural and immunological assessment during a double-blind treatment with naltrexone. *Ann Ist Super Sanita* 1996;32:351–359.
- 241 Al-Ayadhi LY, Halepoto DM, Al-Dress AM, Mitwali Y, Zainah R: Behavioral Benefits of Camel Milk in Subjects with Autism Spectrum Disorder. *J Coll Physicians Surg JCPSP* 2015;25:819–823.
- 242 Bashir S, Al-Ayadhi LY: Effect of camel milk on thymus and activation-regulated chemokine in autistic children: double-blind study. *Pediatr Res* 2014;75:559–563.
- 243 Hu Y, Ehli EA, Boomsma DI: MicroRNAs as biomarkers for psychiatric disorders with a focus on autism spectrum disorder: Current progress in genetic association studies, expression profiling, and translational research. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res* 2017;10:1184–1203.
- 244 Fregeac J, Colleaux L, Nguyen LS: The emerging roles of MicroRNAs in autism spectrum disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2016;71:729–738.
- 245 Inga Jácome MC, Morales Chacòn LM, Vera Cuesta H, Maragoto Rizo C, Whilby Santiesteban M, Ramos Hernandez L, *et al.*: Peripheral Inflammatory Markers Contributing to Comorbidities in Autism. *Behav Sci (Basel, Switzerland)* 2016;6. DOI: 10.3390/bs6040029
- 246 Ahmad SF, Nadeem A, Ansari MA, Bakheet SA, Attia SM, Zoheir KMA, *et al.*: Imbalance between the anti- and pro-inflammatory milieu in blood leukocytes of autistic children. *Mol Immunol* 2017;82:57–65.
- 247 Singh VK: Phenotypic expression of autoimmune autistic disorder (AAD): a major subset of autism. *Ann Clin Psychiatry Off J Am Acad Clin Psychiatr* 2009;21:148–161.
- 248 Kim J-W, Seung H, Kwon KJ, Ko MJ, Lee EJ, Oh HA, *et al.*: Subchronic Treatment of Donepezil Rescues Impaired Social, Hyperactive, and Stereotypic Behavior in Valproic Acid-Induced Animal Model of Autism. *PLoS One* 2014;9:e104927.

- 249 Karvat G, Kimchi T: Acetylcholine Elevation Relieves Cognitive Rigidity and Social Deficiency in a Mouse Model of Autism. *Neuropsychopharmacology* 2014;39:831–840.
- 250 Bakheet SA, Alzahrani MZ, Ansari MA, Nadeem A, Zoheir KMA, Attia SM, *et al.*: Resveratrol Ameliorates Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T Regulatory Cell-Related Transcription Factor Signaling in a BTBR T + tf/J Mouse Model of Autism. *Mol Neurobiol* 2017;54:5201–5212.
- 251 Bakheet SA, Alzahrani MZ, Nadeem A, Ansari MA, Zoheir KMA, Attia SM, *et al.*: Resveratrol treatment attenuates chemokine receptor expression in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *Mol Cell Neurosci* 2016;77:1–10.
- 252 Bhandari R, Kuhad A: Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. *Neurochem Int* 2017;103:8–23.
- 253 Bambini-Junior V, Zanatta G, Della Flora Nunes G, Mueller de Melo G, Michels M, Fontes-Dutra M, *et al.*: Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci Lett* 2014;583:176–181.
- 254 Wu H, Wang X, Gao J, Liang S, Hao Y, Sun C, *et al.*: Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life Sci* 2017;173:43–54.
- 255 Hirsch MM, Deckmann I, Fontes-Dutra M, Bauer-Negrini G, Della-Flora Nunes G, Nunes W, *et al.*: Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. *Food Chem Toxicol* 2018;115:336–343.

Figure 1. Immunological endophenotypes in autism. The identification of specific markers related to different ASD subgroups may assist in reducing the heterogeneity of participants in clinical trials. In addition, animal model trials enable the translational study of new drugs, possible targets and biomarkers.

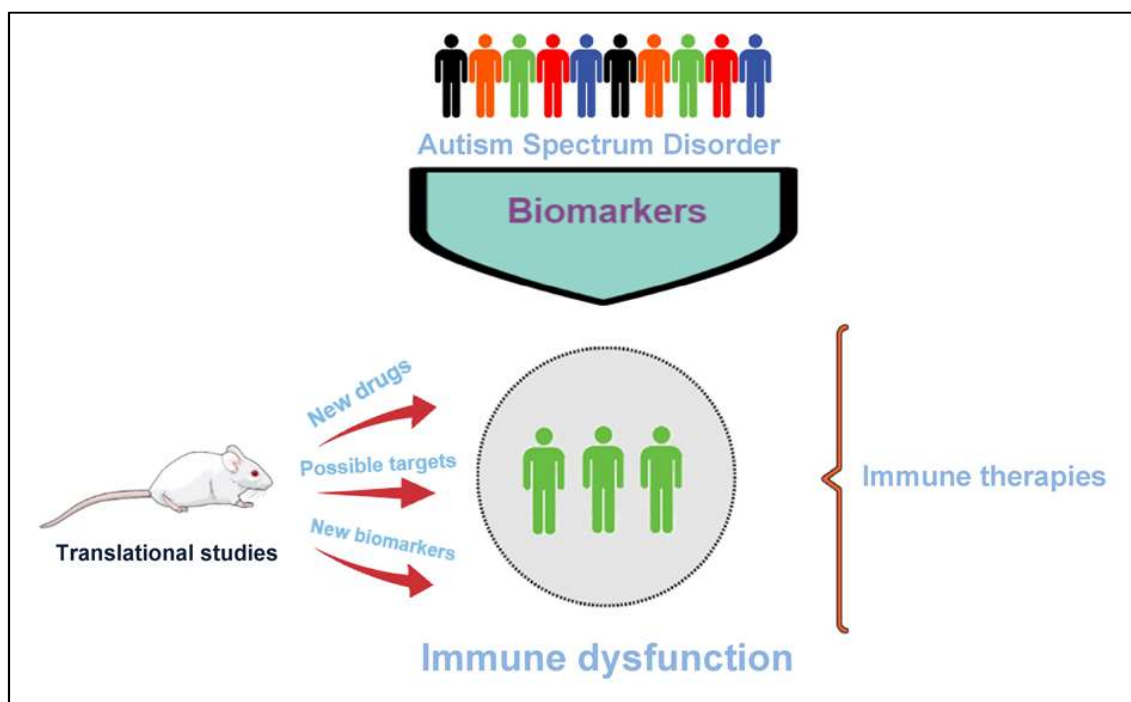


Table 1 – Summary of studies with immunomodulatory therapies in ASD

Therapy	Study	Dosage	Period	n (ASD)	Measures	Finding	Ref.
Sulforaphane	Placebo-controlled, double-blind, randomized, clinical trial	50–150 μ mol	4-18 weeks	40	ABC, SRS, CGI-S, CGI-I	Reduction in the ABC, SRS and CGI-I scores compared to placebo	(59)
Sulforaphane	Case series	Not reported	3 years	16	Descriptive	One of these families reported that the behavioral improvement was maintained even after the discontinuation of sulforaphane use, and nine families are either still taking SF with sustained improvement (Follow-up of paper)	(60)
Celecoxib	Placebo-controlled, double-blind, randomized, clinical trial	200-300 mg	10 weeks	40	ABC	Improvements in irritability, social withdrawal, and stereotypic behavior subscales	(63)
Spirolactone	Case report	2 mg/kg	4 weeks	1	ABC, PPVT-III	Improvement in irritability, lethargy, stereotypy, hyperactivity and inappropriate speech in ABC scale. Increase in language gain in PPVT-III	(81)
Lenalidomide	Open-label study	2,5 mg	12 weeks	7	CARS, ADOS, ROWPVT, CGI-I	Serum TNF- α reduction in 57%. Decreased symptoms of autism based on the CARS scores, CGI expressive language, CGI receptive language at 6 weeks and CGI expressive language at 12 weeks	(65)
Pentoxifylline	Placebo-controlled, double-blind, randomized, clinical trial	400-600 mg	10 weeks	40	ABC, ESRS	Improvement in irritability, social withdrawal, stereotypic behavior, hyperactivity and inappropriate speech in ABC scale	(75)
Pentoxifylline	Open-label study	150-600 mg	Not reported	23	Descriptive	“Remarkably effective” in 10 cases, “fairly effective” in eight cases, “slightly effective” in three cases, and had “no effect” in two patients	(70)
Pentoxifylline	Open-label study	Not reported	Not reported	30	Descriptive	Six patients (20%) showed marked improvement in behavior and 14 (47%) showed slight amelioration of symptoms	(71)

Therapy	Study	Dosage	Period	n (ASD)	Measures	Finding	Ref.
Pentoxifylline	Open-label study	200 mg	3 months	20	Seiken's Critical List for Autistic Children and patients' behavior in specific situations	35% of patients, improvement was observed in at least two of three assessments	(72)
Pentoxifylline	Open-label study	200 mg	4 to 10 months	2	Descriptive	Improvement in pronunciation of syllables and words	(73)
Pentoxifylline	Open-label study	10-15 mg/kg	3 months	20	EEG, "check list for autistic children", Parent-Child Relationship Test	EEG before and after pentoxifylline showed significant differences 39% of patients. Improvement in "playing with a friend" and "personal communication in a psychopathological test"	(74)
Luteolin	Case series	200 mg/10 kg	not reported	37	Descriptive	Improvements in stool characteristics, "allergic problems, eye contact, retention of learning, social interaction, attention to directions and speech	(85)
Luteolin	Open-label study	100 mg/10 kg	26 weeks	50	VABS, ABC, ATEC, CGI-I	Benefit in adaptive functioning (VABS scores) and in the overall behavior (ABC).	(86)
Luteolin	Case report	700 mg + 70 mg bid	12 months	1	ATEC	Improvement in motor stereotypies, hyperactivity and cognitive abilities. Diminishment of enuresis.	(88)
Luteolin	Open-label study	100 mg	26 weeks	40	VABS	Improvements in age-equivalent communication, daily living skills and social domains. Improvement in composite score.	(87)
Prednisolone	Case series	2 mg/kg	Not reported	44	CLSQ, FMAER, EEG	Changes in FMAER responses, improvement of language functions	(90)

Therapy	Study	Dosage	Period	n (ASD)	Measures	Finding	Ref.
Prednisolone	Case report	0.5 mg/kg	1 year	1	REEL, Vineland, Rosetti, Child Autism Rating Scale	Improvement of social abilities, speech and attention span	(91)
Prednisone	Case report	0.5 mg/kg	28 weeks	1	WISC-R	Improvement in language skills and behavior	(92)
Prednisolone	Case series	2 mg/kg	30 months and 48 months	2	Descriptive	Improvement in speech	(93)
Minocycline	Placebo-controlled, double-blind, randomized, clinical trial	100 mg	10 weeks	50	ABC, ESRS	Improvement in irritability and hyperactivity/noncompliance subscales	(126)
Minocycline	Open-label study	1.4 mg/kg	6 months	11	CGI-I, VABS, DAS-II, NVDQ	No clinical improvements	(125)
Pioglitazone	Open-label study	30-60 mg	12-16 weeks	25	ABC	Improvement in hyperactivity, irritability, lethargy and stereotypy subscales	(133)
Pioglitazone	Placebo-controlled, double-blind, randomized, clinical trial	30 mg	10 weeks	40	ABC	Improvement in hyperactivity, irritability and lethargy subscales	(134)
Oral Human Immunoglobulin	Placebo-controlled, double-blind, randomized, clinical trial	140, 420 or 880 mg	12 weeks	125	MGIS	Absence of difference from placebo	(103)

Therapy	Study	Dosage	Period	n (ASD)	Measures	Finding	Ref.
Oral Human Immunoglobulin	Open-label study	420 mg	8 weeks	12	GSI, ABC and CGI-S	Improvement of GI symptoms and behavior	(102)
Intravenous Immunoglobulin	Placebo-controlled, double-blind, randomized, clinical trial	400 mg/kg single dose	13 weeks	12	ABC, Symptom Checklist, CPRS	Amelioration of most ratings on ABC factors and Symptom Checklist scores	(105)
Intravenous Immunoglobulin	Open-label study	400 mg/kg/monthly	6 months	5	Ritvo-Freeman Real Life Rating Scale, C-YBOCS, CGI-AD, A-NIMH	No significant difference	(107)
Intravenous Immunoglobulin	Open-label study	154 to 375 mg/kg per dose (1-6 doses)	19 weeks	10	Descriptive	Only 1 child had autism core symptoms relief	(106)
Intravenous Immunoglobulin	Open-label study	1 g/kg (10 doses)	31 weeks	14	CCC-2, SRS, ABC, CGI-S, CGI-I, ADOS, PPVT. CD154, toll-like receptor-4, memory B cells, FOXP3, lymphocyte stimulation.	Ameliorating of speech and social interactions	(108)
Mononuclear and Mesenchymal Stem Cells	Open-label study	2 x 10 ⁶ CBMNCs/kg and 10 ⁶ UCMSCs/kg	4 infusions (1 every 5-7 days)	36	CARS, ABC and CGI	Combination group was more beneficial than CBMNC alone, and both were more effective than only behavioral therapy	(110)
Fetal Stem Cells	Open-label study	*	2 days	45	ATEC, ABC	Less agitation; improvement in eye contact, appetite and affect	(111)

Therapy	Study	Dosage	Period	n (ASD)	Measures	Finding	Ref.
Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells	Case report	56 × 10 ⁶ MNCs intrathecally	Single infusion	1	CARS	CARS reduced from severely autistic to non-Autistic but the general impression on clinical assessment showed mild autism.	(112)
Embryonic Stem Cells	Case series	**	4 sessions of 4-6 weeks	3	SPECT, descriptive	Improvements in eye coordination, balance, sensory processing, writing and speaking.	(116)
Bone Marrow Aspirate Concentrate	Open-label study	5 ml/kg	Single infusion	10	ISAA, Wee-FIM	Improvements in ISAA	(114)
Autologous Cord Blood	Open-label study	1-5 × 10 ⁷ cells / kg	Single infusion	25	VABS-II, CGI-S, CGI-I, PDDBI, EOWPVT-4 scales. EGT.	Improved eye contact, improvement in all scales employed	(115)
Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells	Open-label study	8.19 × 10 ⁷ cells	Single infusion	32	ISAA, CGI-I, FIM, Wee-FIM	Improvement in all scores	(113)
Dialyzable Lymphocyte Extract	Open-label study	150 IU	3 days every 6-12 weeks	40	SSSA	Amelioration and reversion of symptoms	(118)

*1.6 ml of liver cells suspension with cell count > 30 × 10⁶ cells / ml each transplantation; 2.29 ± 0.49 ml of brain progenitor cells with cell count > 8.70 × 10⁶/ml per transplantation

**0.25 mL of hESCs (< 4 million cells) IM once-a-day; 1 mL (< 16 million cells) given twice a week IV; 1 to 5 mL every 7 days by supplemental routes; nasal spray administered twice a week

Social Responsiveness Scale (SRS), Clinical Global Impression Severity (CGI-S) Scale, Clinical Global Impression Improvement (CGI-I) Scale, Peabody Picture Vocabulary Test III (PPVT-III), Receptive and Expressive One-Word Picture Vocabulary Tests (ROWPVT), Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS), Childhood Autism Rating Scale (CARS), Extrapyramidal Symptoms Rating Scale (ESRS), Seiken's Critical List for Autistic Children, Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition (VABS), Ability Scales Second Edition (DAS-II), Mullen Scales (NVDQ), Modified Global Improvement Scale (MGIS), Gastrointestinal severity index (GSI), Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC), Clinical Language Status Questionnaire (CLSQ) Receptive-expressive emergent language test (REEL), Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised (WISC-R), Children Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale (C-YBOCS), Autism Modification of the NIMH Global Obsessive-Compulsive Scale (A-NIMH), Symptom severity score average (SSSA), Indian Scale for Assessment of Autism (ISAA), Functional Independent Measure (FIM), Functional Independent Measure for children (Wee-FIM).

Table 2 – Side events

Therapy	Side effects	Ref.	Therapy	Side effects	Ref.
Sulforaphane	Greater weight gains possible association with seizures	(59)	Pioglitazone	Transitory and self-limited elevations in white blood counts, glucose levels and liver enzymes	(133)
Lenalidomide	Rash and transient drop of absolute neutrophil count	(65)	Oral Human Immunoglobulin	Skin and subcutaneous tissues disorders	(103)
Pentoxifylline	Nausea, vomiting, low blood pressure and headache	(70)	Oral Human Immunoglobulin	Vomiting, skin rash	(103)
Pentoxifylline	Limited to the gastrointestinal tract	(72)	Intravenous Immunoglobulin	Mild headaches and infusion site reactions	(108)
Luteolin	Increased irritability	(86)	Mononuclear and Mesenchymal Stem Cells	Self-limited low-grade fever	(110)
Prednisolone	Cushing syndrome, irritability. GI bleeding and hypercalcemia (both self-limited).	(90)	Autologous Cord Blood	Allergic reaction, skin changes, agitation, childhood infections	(115)
Minocycline	Gastrointestinal and upper respiratory symptoms; PICA; hematuria; weight gain; hyperactivity; urinary tract infection; otitis media; epistaxis; teeth staining; increased aggression, head-banging, sensitivity to lights, appetit and ritualistic behavior	(125)	Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells	Headache, nausea and vomiting, pain in procedure site, seizures	(113)

11 ARTIGO 2 - EFEITO DO TRATAMENTO COM RESVERATROL EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA – UM ESTUDO PILOTO.

Efeito do tratamento com resveratrol em sujeitos pediátricos com transtorno do espectro autista – um estudo piloto

Josemar Marchezan^{1,2,3,4}, Iohanna Deckmann^{2,3,4,5}, Guilherme Cordenonsi da Fonseca^{2,3,4,6}, Rogerio Margis^{4,6}, Rudimar Riesgo^{1,2,4,7}, Carmem Gottfried^{2,3,4,5}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Grupo de Pesquisa Translacional do Transtorno do Espectro Autista-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação-INCT-NIM.

⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁶Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁷Departamento de Pediatria, Unidade de Neurologia Infantil, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

RESUMO

Introdução: O transtorno do espectro autista (TEA) envolve uma interação complexa de fatores de risco genéticos e ambientais, com alterações imunológicas, inflamatórias, desbalanço redox e alterações na conexão sináptica ao longo do desenvolvimento. O resveratrol (RSV) é polifenol de origem vegetal, presente especialmente nas cascas e sementes de uvas, com importantes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras. **Objetivos:** Avaliar a eficácia e segurança do RSV em sujeitos pediátricos com diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista (TEA). **Metodologia:** Por meio de ensaio clínico piloto, aberto, administrou-se RSV 200mg ao dia pelo período de 90 dias em 5 pacientes com autismo. Os desfechos foram medidos através

da escala *Aberrant Behavior Checklist* (ABC) e *Clinical Global Impression – Improvement* (CGI-I), da avaliação de exames laboratoriais e da expressão de 8 microRNA. **Resultados:** Todos os participantes eram do sexo masculino, com idade entre 10 e 13 anos. Os resultados demonstram redução significativa nos escores da escala ABC total ($p=0,042$) e da subescala Irritabilidade ($p=0,041$). As subescalas Comportamento estereotipado ($p=0,066$), Hiperatividade ($p=0,068$) e Letargia e esquivas social ($p=0,078$) tiveram redução limítrofe para significância. Ao fim dos 90 dias de tratamento, pela escala CGI-I, três (60%) dos cinco participantes estavam melhor, 1 ligeiramente melhor e 1 não apresentou alterações. Não houve efeitos adversos, nem variações laboratoriais associados ao uso do RSV. Dos 8 microRNA avaliados, houve diferença de expressão pré e pós resveratrol em 3 microRNA (miR-124-3p, miR-125a-5p e miR-195-5p). **Conclusões:** Os resultados deste estudo piloto sugerem que o RSV é seguro no uso em pacientes pediátricos e que possa ter um papel no tratamento dos sintomas do TEA, inclusive induzindo alterações na expressão de microRNA com função moduladora inflamatória.

Palavras-chave: Resveratrol. Neuroinflamação. Inflamação. Autismo. Transtorno do espectro autista.

Introdução

O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio do desenvolvimento neurológico de base biológica caracterizado por alterações em dois domínios comportamentais principais: 1) déficits na comunicação e interação sociais e 2) padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades (ASSOCIATION, 2013). A última prevalência estimada de TEA pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) é de 16,8 por 1000 crianças (1 em 59), afetando 26,6/1000 meninos e 6,6/1000 meninas. Essa prevalência representa um aumento de aproximadamente 150% entre os anos 2000 e 2014 (BAIO *et al.*, 2018).

A etiologia do TEA permanece não completamente elucidada (GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018). Contudo, o número crescente de publicações, especialmente na última década, não deixa dúvidas quanto ao aspecto multifatorial do espectro e indica uma interação complexa entre fatores genéticos/ambientais e fatores do sistema imunológico (GOTTFRIED *et al.*, 2015).

A disfunção imunológica tem sido uma característica reconhecida nos distúrbios do espectro autista há várias décadas e tem sido destacada em revisões recentes (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015;

MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014). Muitos pesquisadores sugerem a possibilidade de que a disfunção imune no TEA possa ser caminho viável para a intervenção farmacológica, e um subgrupo de indivíduos com TEA poderia se beneficiar de terapias de base imunológica (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

O Resveratrol (RSV) é uma molécula simples inicialmente isolada em extrato derivado da planta *Cassia quinquangulata*, originária do Peru, durante a procura por novos agentes quimiopreventivos contra o câncer (JANG *et al.*, 1997). Os polifenóis, especialmente o *trans*-RSV, vem recebendo atenção especial da comunidade científica devido aos inúmeros estudos mostrando seu papel terapêuticos em diversas doenças, como câncer, doenças cardíacas, diabetes tipo 2 e doenças neurodegenerativas. É provável que diferentes mecanismos estejam envolvidos, mas a modulação da inflamação seria o mecanismo unificador (VANG *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, estudos em modelos animais de TEA usando RSV tanto no período pré-natal como pós-natal sugerem que ele possa atenuar os sintomas do espectro (incluindo melhora do comportamento social, redução do comportamento repetitivo e alterações na sensibilidade) e melhorar disfunção imune (AHMAD *et al.*, 2018; BAKHEET *et al.*, 2016, 2017; BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2014; BHANDARI; KUHAD, 2017; FONTES-DUTRA *et al.*, 2018; HIRSCH *et al.*, 2018a; LI *et al.*, 2009).

Uma vez que os critérios para diagnóstico do TEA são clínicos e resultam de análises comportamentais, os microRNA surgem como uma importante ferramenta biomarcadora. Eles poderiam auxiliar no diagnóstico precoce, na mensuração de risco de desenvolvimento do TEA, na avaliação do prognóstico, na caracterização de subgrupos de pacientes e na definição de subconjuntos de indivíduos que responderiam mais favoravelmente a tratamentos específicos (ANDERSON, 2015; GOLDANI *et al.*, 2014; ZWAIGENBAUM; PENNER, 2018). Os microRNA (miRNA) são pequenos RNA não-codificantes com 19-25 nucleotídeos que atuam como reguladores da tradução de RNA mensageiros em suas respectivas proteínas, controlando diversos processos celulares (AMBROS, 2004). Níveis alterados de alguns miRNA têm sido implicados em várias

desordens do SNC (DE SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; SAUGSTAD, 2010). No entanto, ainda há poucos estudos demonstrando o papel dos miRNA no TEA (KAMAL; MUSHTAQ; GREIG, 2015).

No presente estudo, foi administrado RSV a crianças com TEA para avaliação de possíveis efeitos terapêuticos, tolerabilidade e segurança. Também avaliada sua ação sobre a expressão de diferentes miRNA.

Materiais e Métodos

Delineamento do Estudo e Logística

Este é um estudo piloto na forma de ensaio clínico aberto para avaliação de eficácia e tolerabilidade de RSV 200mg ao dia em sujeitos pediátricos com diagnóstico de TEA. O estudo ocorreu de outubro de 2017 a janeiro de 2018. Os pacientes foram recrutados no Ambulatório de TEA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e as escalas e coletas de sangue foram realizadas no Centro de Pesquisas Clínicas (CPC) do HCPA. As análises laboratoriais foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do HCPA e a análise de expressão dos microRNA no Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica – UFRGS.

Sujeitos

Foram incluídos no estudo pacientes do sexo masculino com diagnóstico de TEA pelos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, 5ª edição (ASSOCIATION, 2013) com idade entre 10 e 18 anos. Medicamentos psicotrópicos eram permitidos desde que estivessem com as doses estáveis por no mínimo 4 semanas antes da inclusão, sem necessidade de adequação da dose ao longo do estudo.

Os sujeitos foram excluídos do estudo se apresentassem qualquer um dos critérios a seguir: 1) Presença de doenças com características comuns ao autismo, como: Síndrome de X frágil, Síndrome de Rett, Síndrome de Angelman, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Smith-Lemli-Opitz e Esclerose Tuberosa; 2) Necessidade de ajuste de dose ou interrupção de medicação de base no período do estudo; 3) Uso de

anticonvulsivantes; 4) Presença de doença sistêmica em atividade (como cardiopatia, hepatopatia, nefropatia); 5) Qualquer condição que, no parecer do investigador, colocaria a segurança do sujeito em risco após a exposição à substância em estudo.

Intervenção

Os sujeitos receberam RSV na dose de 200mg/dia (duas cápsulas de 100mg em tomada única diária pela manhã) por 90 dias. O RSV utilizado apresenta níveis de pureza adequados para ensaios clínicos (99% *trans*-RSV, Farmácia Reativa, Porto Alegre, RS).

Medidas de resposta

Os sintomas do espectro autista foram avaliados através da escalas Lista de Checagem de Comportamento (do inglês, *Aberrant Behavior Checklist, ABC*) (AMAN *et al.*, 1985; LOSAPIO *et al.*, 2011) e Impressão Global Clínica – Melhora (do inglês, *Clinical Global Impression – Improvement, CGI-I*) (GUY W, 1976) previamente e após 90 dias de tratamento.

Para melhor avaliar os efeitos adversos da administração do RSV, optou-se por coleta de exames laboratoriais por punção de veia periférica, antes do início do uso e após 45 e 90 dias. Nessas amostras foram realizadas as seguintes análises: hemograma com plaquetas, transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), amilase, bilirrubina total e frações, glicose, colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, desidrogenase láctica e creatinina.

Também foram avaliadas a expressões de um conjunto de 8 microRNA relacionados com sistema imune e plasticidade neural (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p) antes e após 90 dias de tratamento.

Extração de microRNA

Coleta de PBMCs

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram coletadas a partir de 5 ml de sangue periférico retirado de cada indivíduo por venopunção em tubos de EDTA e isoladas por gradiente de densidade (Histopaque 1,077 g/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri) de acordo com as instruções do fabricante.

O sangue total foi centrifugado a 1200 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente. O plasma foi retirado e imediatamente armazenado em TRIzol® (1:2). O sangue foi reconstituído com PBS no mesmo volume de plasma retirado. O sangue anticoagulado reconstituído foi depositado sobre o Histopaque-1077 e centrifugado a 400 g (rcf) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os linfócitos e outras células mononucleares permanecem na interface plasma/Histopaque 1,077. As PBMCs foram aspiradas, transferidas para um tubo de centrífuga cônico limpo e lavadas com solução isotônica de salina tamponada com fosfato (PBS). Após nova centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, o sedimento contendo as células foi ressuspensão em PBS e as células foram ressuspensas para contagem. As PBMCs purificadas foram marcadas com azul de tripan (1:10) e contadas manualmente com um hemocitômetro. As células foram também imediatamente armazenadas em TRIzol®.

Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa (RT-qPCR)

O RNA total das amostras de plasma foi isolado usando QIAzol® (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada de acordo com (CHEN *et al.*, 2005). Foi adicionado 1.25 mM de 20 *primers stem-loop* (U6, RNU6, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p) ao mix contendo RNA, oligo(dT)25V (5 mM), 250 mM de dNTPs (Ludwig, RS, Porto Alegre, Brasil) e água livre de RNase para um volume total de 17 ml seguido de uma incubação a 65°C por 5 minutos e resfriamento em gelo. A enzima MML-V RT (New England Biolabs, MA, USA) foi usada para a síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante. Cada mix de reação foi incubado a 16°C por 30 minutos seguido de outros 30 minutos a 42°C. Todas as amostras de cDNA

foram diluídos 50 vezes em água livre de RNase. Os *primers stem-loop*, *primers* de iniciação e o *primer* universal reverso foram desenhados de acordo com (CHEN *et al.*, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real foi realizada no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX384 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O PCR foi realizado no volume de 10 μ L contendo 5 μ L de cDNA diluído (1:50), 1 \times SYBR Green I (Invitrogen, CA, USA), 0.1mM de dNTPs, 1 \times Tampão de PCR, 3mM MgCl₂, 0.25U de Taq DNA Polimerase (Quatro G, RS, Porto Alegre, Brazil) e 200 nM de cada *primer* de iniciação e reverso. Amostras foram analisadas em triplicatas biológicas em placa de 384 poços, e, um controle foi incluído. Os genes de referência foram escolhidos de acordo com o software GeNorm para determinar o número de miRNA necessários para normalização e para identificar os miRNA mais pcr foram setadas como segue: uma etapa inicial de ativação da polimerase por 5 min. a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 10 segundos a 60 °C para anelamento e 10 segundos a 72 °C para alongamento. A análise da curva de *melting* foi programada ao fim da corrida de PCR no intervalo de 65 a 95 °C, e a temperatura aumentou gradualmente em 0.4 °C. O limite e as linhas de base foram determinados manualmente usando o software do gerenciador Bio-Rad CFX. Para calcular a expressão relativa dos miRNA foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O teste t de Student foi realizado para comparar as diferenças de expressão entre as diferentes amostras. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

Considerações éticas

O protocolo foi aprovado pela Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (CPE-HCPA) sob número 17-0132 (CAAE 65862917100005327). Os pais e/ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Análise estatística

Como se tratava de um estudo piloto para prova de conceito e não existiam dados de segurança do uso de RSV em crianças, optou-se por sua administração em número reduzido de sujeitos, sem cálculo de tamanho amostral.

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 21.0, onde foram processados e analisados.

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

Para a comparação das médias de valores da escala ABC foi usado o teste t de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas, e para o cálculo do tamanho do efeito foi utilizada a fórmula *d* de *Cohen*, ajustada para *n* menor que 50. Na comparação de valores de expressão dos miRNA, incluiu-se um valor por normalizador em cada amostra (HIRSCH *et al.*, 2018b) e foi utilizado teste t de *Student* para amostras emparelhadas. Para significância estatística, foi considerado um valor de *p* igual ou menor a 0,05.

Resultados

A amostra foi constituída de 5 crianças do sexo masculino. A idade variou de 10 a 13 anos, com média de 11,8 ($\pm 1,1$) anos. Dois pacientes apresentavam inteligência normal (sujeitos 3 e 5), conforme medidas de QI por testes psicométricos; os demais apresentavam funcionamento compatível com deficiência intelectual leve (sujeito 4) e deficiência intelectual moderada (sujeitos 1 e 2). Três dos sujeitos apresentavam comunicação verbal preservada (sujeitos 3, 4 e 5), um falava somente frases curtas (sujeito 1) e um apresentava somente fala ecológica (sujeito 2). Dois pacientes faziam uso de medicações psicotrópicas (40%), sertralina e aripiprazol. Todos os pacientes faziam pelo menos um tratamento não medicamentoso. As características da amostra estão resumidas na Tabela 1.

Ao fim dos 90 dias de tratamento, pela escala CGI-I, três (60%) dos cinco participantes estavam melhor, 1 ligeiramente melhor e 1 não apresentou alterações.

Comparando-se as médias dos escores da escala ABC, verificou-se uma redução no escore total da escala e todas as suas subescalas. O escore total e a subescala Irritabilidade apresentaram diferença estatisticamente significativa (Tabela 2). Na Tabela 3 encontram-se os escores de todos os sujeitos e sua variação após o uso de RSV.

Dos 8 miRNA avaliados em PBMCs, o algoritmo GeNorm classificou os 21-5p, 30c-5p e 191-5p como os mais estáveis, e eles foram usados como normalizadores

para avaliar a expressão relativa do demais miRNA. Dos 5 restantes, três miRNA apresentaram aumento significativo na expressão relativa após 90 dias do uso de RSV: miR-124-3p ($p=0,021$), miR-125a-5p ($p=0,036$) e miR-195-5p ($1,61515E^{-07}$) (Figura 1).

Nenhum paciente apresentou efeitos colaterais, e o RSV foi bem tolerado. Todos os pacientes completaram o estudo e não ocorrem alterações laboratoriais durante a pesquisa, resultados descritos na Tabela 4.

Discussão

Até o momento, nenhum tratamento disponível é capaz de reverter completamente os principais sintomas do TEA (BENVENUTO *et al.*, 2013; EISSA *et al.*, 2018). Apenas dois medicamentos, risperidona e aripiprazol, são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de sintomas disruptivos nesses pacientes (EISSA *et al.*, 2018; SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018) e estão associados a eventos metabólicos adversos, como ganho de peso, dislipidemia e hiperglicemia (YOUNG; FINDLING, 2015). O comprometimento individual, afetando muitas facetas do funcionamento diário (MASI *et al.*, 2017), o efeito econômico direto e indireto dos tratamentos e o sofrimento da família reforçam a necessidade de busca contínua por intervenções efetivas (BUESCHER *et al.*, 2014; KARST; VAN HECKE, 2012; MARCHEZAN *et al.*, 2017; SMITH; GREENBERG; MAILICK, 2014; WEISS *et al.*, 2012).

Pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho com uso de RSV tanto em crianças quanto em pacientes com diagnóstico de TEA. Assim como nos modelos animais, nosso estudo sugere que o RSV possa reduzir os sintomas do TEA. Verificamos que após 3 meses do uso do medicamento, 3 crianças estavam melhor e uma ligeiramente melhor pela escala CGI-I. Houve também redução nos escores da escala ABC, com significância estatística no escore total e subescala Irritabilidade. As subescalas Letargia e esquiva social, Comportamento estereotipado e Hiperatividade apresentaram melhora com $p<0,1$, caracterizando uma resposta marginalmente significativa; possivelmente, esses achados apresentariam diferença significativa com amostras maiores. Os dois pacientes (sujeitos 3 e 5) com inteligência normal foram aqueles com melhores respostas, mostrando uma possível tendência do RSV a ser mais eficaz nos pacientes com maior capacidade cognitiva. Na nossa amostra, 60% dos pacientes apresentavam fala preservada

e 20% não apresentava comunicação verbal efetiva, o que poderia justificar a baixa resposta na subescala Fala inapropriada.

O RSV foi bem tolerado, e nenhum paciente apresentou efeitos colaterais. Estudos prévios em adultos referiram reações adversas leves e autolimitadas, principalmente com doses maiores que 500mg ao dia (ALMEIDA *et al.*, 2009; ELLIOTT *et al.*, 2009; HEEBØLL *et al.*, 2016; LA PORTE *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2014), e ausência de efeitos colaterais em estudos com doses menores que 500mg (BEDADA; NEERATI, 2016; FAGHIHZADEH; ADIBI; HEKMATDOOST, 2015; LIN; SUN; LIN, 2016; MACEDO *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2010; POLLEY *et al.*, 2016; THAZHATH *et al.*, 2016; TURNER *et al.*, 2015; WONG *et al.*, 2011, 2013; ZORTEA *et al.*, 2016). Alguns estudos anteriores em adultos descreveram alterações hematológicas e aumento do colesterol, contudo, no trabalho atual não ocorreram alterações após 45 ou 90 dias do uso da medicação (BO *et al.*, 2016; HEEBØLL *et al.*, 2016; VODUC *et al.*, 2014).

Após o tratamento com RSV, houve um aumento de expressão dos microRNA miR-124-3p, miR-125a-5p e miR-195-5p. Recente estudo do nosso grupo não verificou diferença expressão desses três miRNA no sangue de pacientes com TEA em relação aos controles (HIRSCH *et al.*, 2018c), contudo, estudos anteriores encontraram o miR-195-5p com aumento de expressão em linfócitos e soro de crianças com TEA (MUNDALIL VASU *et al.*, 2014; SARACHANA *et al.*, 2010). Além disso, nosso grupo evidenciou que o RSV pode modificar a expressão de miRNA em modelo animal de autismo (HIRSCH *et al.*, 2018a).

Os miRNA cuja expressão foi alterada pelo RSV estão associados a inflamação. Estudos em modelos animais e humanos mostraram evidências de alterações no funcionamento do sistema imunológico central e periférico no TEA, incluindo estimulação de células imunes, geração de auto-anticorpos, desequilíbrio de citocinas/quimiocinas e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (GOTTFRIED *et al.*, 2015).

O miR-124 é conhecido por ser abundante em neurônios, estando associado à diferenciação neuronal (MAKEYEV *et al.*, 2007; MISHIMA *et al.*, 2007). Em modelos de trauma cranioencefálico e medular, o aumento do miR-124-3p tem efeito inibitório na neuroinflamação através da redução de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e aumento da IL-10. O miR-124 também suprime a sinalização mTOR, via reguladora da resposta inflamatória cuja desregulação está relacionada à esclerose tuberosa e TEA (HASBANI; CRINO, 2018; HUANG *et al.*, 2018; LOUW *et al.*, 2016; ONORE *et al.*, 2017; WINDEN;

EBRAHIMI-FAKHARI; SAHIN, 2018). Interessantemente, o RSV tem efeitos benéficos em modelos de lesão medular através da inibição da via mTOR (ZHOU *et al.*, 2018).

O miR-125a-5p regula negativamente a expressão de quimiocina CCL5 através da via fator de fator Kruppel-like 13 (KLF13) em células T ativadas, e sua regulação negativa teria papel na autoimunidade relacionada ao lúpus eritematoso sistêmico (WANG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2010). O aumento da sua expressão tem efeito negativo na regulação da via NFκB (KIM *et al.*, 2012), além de um papel importante na supressão da ativação de macrófagos (BANERJEE *et al.*, 2013; GRAFF *et al.*, 2012). Na doença de Graves, uma doença autoimune, a expressão de miR-125a em PBMCs encontra-se reduzida (INOUE *et al.*, 2014).

O miR-195 está associado à inibição da ativação pró-inflamatória de macrófagos, reduzindo significativamente os níveis de citocinas inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α (BRAS *et al.*, 2017). Também suprime o processo inflamatório através das vias do TNF-α/NF-κB e VEGF/PI3K/Akt (MA *et al.*, 2018).

Apesar de observar melhoras nos sintomas do TEA, o número reduzido da amostra, a natureza aberta do estudo e o potencial efeito placebo secundário à expectativa da família impossibilitam conclusões definitivas sobre benefícios do RSV em pacientes com TEA. Contudo, os resultados indicam que o RSV pode ser seguro infância, pode reduzir sintomas do TEA e alterar alvos moleculares (miR-124-3p, miR-125a-5p e miR-195-5p) com papel nas respostas inflamatórias.

Conclusões

Os resultados deste estudo piloto, apesar do tamanho reduzido da amostra, sugerem a segurança do uso de RSV em crianças e seu possível efeito benéfico nos sintomas do TEA. O RSV também aumentou a expressão dos miR-124, miR-125a-5p e miR-195-5p, microRNA com ação na modulação da resposta inflamatória. Novos ensaios clínicos controlados por placebo são necessários para confirmar o potencial terapêutico e a segurança do RSV em crianças com TEA. O papel dos miR-124-3p, miR-125a-5p, miR-195-5p e outros miRNA na fisiopatogenia do TEA também merece ser alvo de novas pesquisas.

Agradecimentos

Ao Fundo de Investimento em Pesquisas e Eventos (FIPE-HCPA), ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Faculdade de Medicina (UFRGS) e ao Grupo de Pesquisas Translacionais em Transtorno do Espectro Autista (GETTEA- UFRGS).

Referências

- AHMAD, S. F. *et al.* Resveratrol Improves Neuroimmune Dysregulation Through the Inhibition of Neuronal Toll-Like Receptors and COX-2 Signaling in BTBR T+ Itpr3tf/J Mice. **NeuroMolecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 133–146, 21 mar. 2018.
- ALMEIDA, L. *et al.* Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53 Suppl 1, p. S7–15, maio 2009.
- AMAN, M. G. *et al.* The aberrant behavior checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. **American Journal of Mental Deficiency**, v. 89, n. 5, p. 485–491, mar. 1985.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350–5, 16 set. 2004.
- ANDERSON, G. M. Autism Biomarkers: Challenges, Pitfalls and Possibilities. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, n. 4, p. 1103–1113, 6 abr. 2015.
- ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)**. [s.l.] American Psychiatric Pub, 2013.
- BAIO, J. *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 67, n. 6, p. 1–23, 27 abr. 2018.
- BAKHEET, S. A. *et al.* Resveratrol treatment attenuates chemokine receptor expression in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 77, p. 1–10, 2016.
- BAKHEET, S. A. *et al.* Resveratrol Ameliorates Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T Regulatory Cell-Related Transcription Factor Signaling in a BTBR T + tf/J Mouse Model of Autism. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5201–5212, 2017.
- BAMBINI-JUNIOR, V. *et al.* Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, v. 583, p. 176–181, 2014.
- BEDADA, S. K.; NEERATI, P. Resveratrol Pretreatment Affects CYP2E1 Activity of Chlorzoxazone in Healthy Human Volunteers. **Phytotherapy research: PTR**, v. 30, n. 3, p. 463–468, mar. 2016.
- BENVENUTO, A. *et al.* Pharmacotherapy of autism spectrum disorders. **Brain and Development**, v. 35, n. 2, p. 119–127, 2013.

BHANDARI, R.; KUHAD, A. Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. **Neurochemistry International**, v. 103, p. 8–23, 2017.

BO, S. *et al.* Six months of resveratrol supplementation has no measurable effect in type 2 diabetic patients. A randomized, double blind, placebo-controlled trial. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 896–905, set. 2016.

BUESCHER, A. V. S. *et al.* Costs of Autism Spectrum Disorders in the United Kingdom and the United States. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 721, 1 ago. 2014.

CAREAGA, M.; VAN DE WATER, J.; ASHWOOD, P. Immune dysfunction in autism: a pathway to treatment. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 7, n. 3, p. 283–292, 2010.

CHEN, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e179–e179, 27 nov. 2005.

CHEZ, M. G.; GUIDO-ESTRADA, N. Immune therapy in autism: historical experience and future directions with immunomodulatory therapy. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 7, n. 3, p. 293–301, 2010.

DE SMAELE, E.; FERRETTI, E.; GULINO, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. **Brain research**, v. 1338, p. 100–11, 18 jun. 2010.

EISSA, N. *et al.* Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 304, 16 maio 2018.

ELLIOTT, P. J. *et al.* Resveratrol/SRT-501. **Drugs of the Future**, v. 34, n. 4, p. 291, 2009.

FAGHIHZADEH, F.; ADIBI, P.; HEKMATDOOST, A. The effects of resveratrol supplementation on cardiovascular risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **The British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 5, p. 796–803, set. 2015.

FONTES-DUTRA, M. *et al.* Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 10, p. 9, 22 maio 2018.

GLĄDYSZ, D.; KRZYWDZIŃSKA, A.; HOZYASZ, K. K. Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder-Could They Hold Promise for Causative Treatment? **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6387–6435, jan. 2018.

GOLDANI, A. A. S. *et al.* Biomarkers in autism. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 100, 12 ago. 2014.

GOTTFRIED, C. *et al.* The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, p. 121, 2015.

GUY W. **ECDEU assessment manual for psychopharmacology**: Guy, William : **Free Download, Borrow, and Streaming: Internet Archive**. Disponível em: <<https://archive.org/details/ecdeuassessmentm1933guyw>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

HASBANI, D. M.; CRINO, P. B. Tuberous sclerosis complex. In: **Handbook of clinical neurology**. [s.l: s.n.]. v. 148p. 813–822.

HEEBØLL, S. *et al.* Placebo-controlled, randomised clinical trial: high-dose resveratrol treatment for non-alcoholic fatty liver disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 4, p. 456–464, 2016.

HIRSCH, M. M. *et al.* Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 336–343, maio 2018a.

HIRSCH, M. M. *et al.* Sex Differences and Estrous Cycle Changes in Synaptic Plasticity-related microRNA in the Rat Medial Amygdala. **Neuroscience**, v. 379, p. 405–414, 21 maio 2018b.

HIRSCH, M. M. *et al.* Data on social transmission of food preference in a model of autism induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Data in brief**, v. 18, p. 1433–1440, jun. 2018c.

HUANG, S. *et al.* Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 32, n. 1, p. 512–528, jan. 2018.

KAMAL, M. A.; MUSHTAQ, G.; GREIG, N. H. Current Update on Synopsis of miRNA Dysregulation in Neurological Disorders. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 14, n. 4, p. 492–501, 2015.

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

LA PORTE, C. *et al.* Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 7, p. 449–454, jul. 2010.

LI, X. *et al.* Elevated immune response in the brain of autistic patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 207, n. 1–2, p. 111–116, fev. 2009.

LIN, C.-T.; SUN, X.-Y.; LIN, A.-X. Supplementation with high-dose trans-resveratrol improves ultrafiltration in peritoneal dialysis patients: a prospective, randomized, double-blind study. **Renal Failure**, v. 38, n. 2, p. 214–221, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LOSAPIO, M. F. *et al.* [Partial cross-cultural adaptation of the Aberrant Behavior Checklist (ABC) scale for analysis of patients with mental retardation]. **Cadernos De Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 909–923, maio 2011.

LOUW, A. M. *et al.* Chitosan polyplex mediated delivery of miRNA-124 reduces activation of microglial cells in vitro and in rat models of spinal cord injury. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 12, n. 3, p. 643–653, abr. 2016.

MACEDO, R. C. S. *et al.* Effects of chronic resveratrol supplementation in military firefighters undergo a physical fitness test—a placebo-controlled, double blind study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 89–95, fev. 2015.

- MAKEYEV, E. V *et al.* The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. **Molecular cell**, v. 27, n. 3, p. 435–48, 3 ago. 2007.
- MARCHEZAN, J. *et al.* A Placebo-Controlled Crossover Trial of Gastrin-Releasing Peptide in Childhood Autism. **Clinical Neuropharmacology**, v. 40, n. 3, p. 108–112, 2017.
- MASI, A. *et al.* Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 440–446, 2015.
- MASI, A. *et al.* The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 194–204, 2017.
- MCDUGLE, C. J. *et al.* Toward an immune-mediated subtype of autism spectrum disorder. **Brain Research**, v. 1617, p. 72–92, 2015.
- MEAD, J.; ASHWOOD, P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 49–55, 2015.
- MISHIMA, T. *et al.* RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS. **Brain research**, v. 1131, n. 1, p. 37–43, 2 fev. 2007.
- MUNDALIL VASU, M. *et al.* Serum microRNA profiles in children with autism. **Molecular Autism**, v. 5, p. 40, 2014.
- NORIEGA, D. B.; SAVELKOUL, H. F. J. Immune dysregulation in autism spectrum disorder. **European Journal of Pediatrics**, v. 173, n. 1, p. 33–43, 2014.
- ONORE, C. *et al.* Dynamic Akt/mTOR Signaling in Children with Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, p. 43, 15 mar. 2017.
- PATEL, K. R. *et al.* Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer Research**, v. 70, n. 19, p. 7392–7399, out. 2010.
- POLLEY, K. R. *et al.* Influence of exercise training with resveratrol supplementation on skeletal muscle mitochondrial capacity. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 41, n. 1, p. 26–32, jan. 2016.
- SARACHANA, T. *et al.* Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. **Genome Medicine**, v. 2, n. 4, p. 23, 2010.
- SAUGSTAD, J. A. MicroRNAs as Effectors of Brain Function with Roles in Ischemia and Injury, Neuroprotection, and Neurodegeneration. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 9, p. 1564–1576, 7 set. 2010.
- SMITH, L. E.; GREENBERG, J. S.; MAILICK, M. R. The family context of autism spectrum disorders: influence on the behavioral phenotype and quality of life. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 143–155, 2014.
- THAZHATH, S. S. *et al.* Administration of resveratrol for 5 wk has no effect on glucagon-like peptide 1 secretion, gastric emptying, or glycemic control in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 103, n. 1, p. 66–70, jan. 2016.
- TURNER, R. S. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. **Neurology**, v. 85, n. 16, p. 1383–1391, out. 2015.

VERKHRATSKY, A.; RODRÍGUEZ, J. J.; PARPURA, V. Neuroglia in ageing and disease. **Cell and Tissue Research**, v. 357, n. 2, p. 493–503, 2014.

VODUC, N. *et al.* Effect of resveratrol on exercise capacity: a randomized placebo-controlled crossover pilot study. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 10, p. 1183–1187, out. 2014.

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

WINDEN, K. D.; EBRAHIMI-FAKHARI, D.; SAHIN, M. Abnormal mTOR Activation in Autism. **Annual Review of Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. annurev-neuro-080317-061747, 9 jul. 2018.

WONG, R. H. X. *et al.* Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 21, n. 11, p. 851–856, nov. 2011.

WONG, R. H. X. *et al.* Chronic resveratrol consumption improves brachial flow-mediated dilatation in healthy obese adults. **Journal of Hypertension**, v. 31, n. 9, p. 1819–1827, set. 2013.

ZHOU, J. *et al.* Beneficial Effects of Resveratrol-Mediated Inhibition of the mTOR Pathway in Spinal Cord Injury. **Neural plasticity**, v. 2018, p. 7513748, 2018.

ZORTEA, K. *et al.* Resveratrol Supplementation in Schizophrenia Patients: A Randomized Clinical Trial Evaluating Serum Glucose and Cardiovascular Risk Factors. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 73, jan. 2016.

ZWAIGENBAUM, L.; PENNER, M. Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. k1674, 21 maio 2018.

Tabela 1 – Característica da Amostra.

Sujeito	Idade	QI	CGI-G	Exames	Terapias	Medicamentos
1	12	DI mod	Moderadamente doente	PEA, EEG, Cariótipo, Pesquisa de X-frágil e RNM normais	Psico, Fono, TO, escola	Sem uso
2	12	DI mod	Marcadamente doente	Audiometria, EEG, Cariótipo, Pesquisa de X-frágil e RNM normais	Fono, escola	Sem uso
3	13	133	Moderadamente doente	Cariótipo, Pesquisa de X-frágil e EEG normais	Psicopedagogia, musicoterapia, escola	Sem uso
4	10	DI leve	Moderadamente doente	EEG, Cariótipo, Pesquisa de X-frágil e RNM normais	Psico, Fono, TO, escola	Sertralina e Aripiprazol
5	12	120	Moderadamente doente	EEG com paroxismos focais	Psico, psicopedagogia, escola	Sertralina

DI – Deficiência Intelectual; Mod – moderada; PEA – potencial evocado auditivo; EEG – eletroencefalograma; RNM – Ressonância Nuclear Magnética; Psico – psicologia; Fono - fonoaudiologia; TO – Terapia Ocupacional.

Tabela 2. Médias dos escores da escala *Aberrant Behavior Checklist* antes e após tratamento com Resveratrol.

Subescala	Pré-RVS	Pós-RVS	P	Tamanho do efeito
Escore total	70,0± 9,48	56,2 ±17,1	0,042	0,561
Irritabilidade	17,0± 5,52	12,4± 3,57	0,041	0,557
Letargia e esquiva social	20,4±7,36	16,8±8,28	0,078	0,259
Comportamento estereotipado	7,00±2,44	5,20±3,56	0,066	0,332
Hiperatividade	19,40±5,17	17,20±6,45	0,068	0,212
Fala inapropriada	6,20±4,26	4,60±4,15	0,109	0,214

*Média±DP

Tabela 3 - Escores da escala *Aberrant Behavior Checklist* antes e após tratamento com Resveratrol.

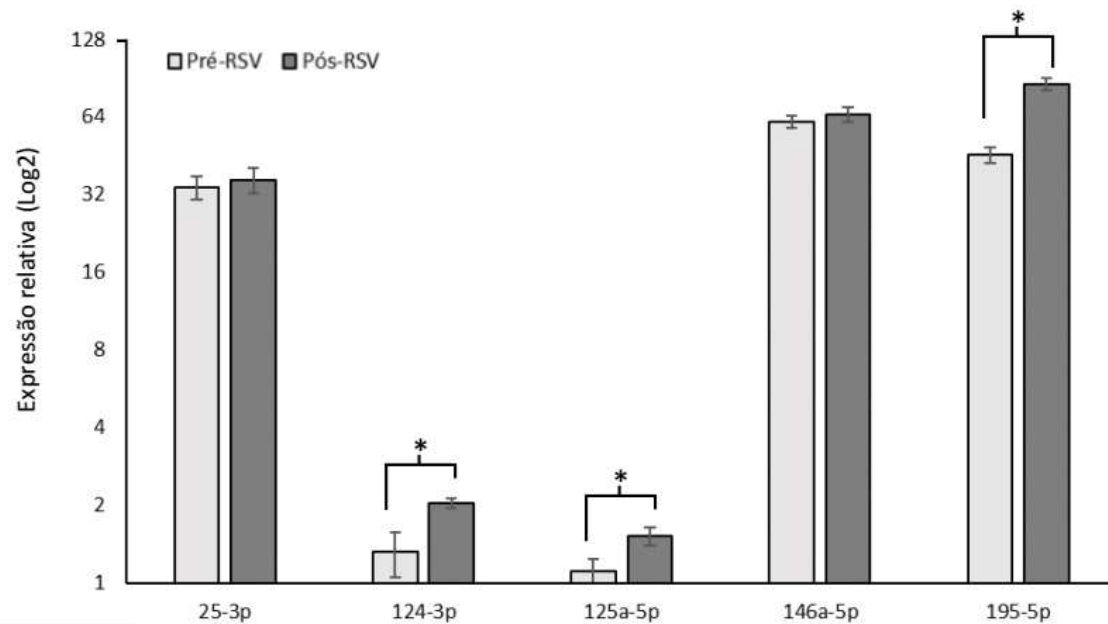
Escala ABC	Sujeito 1			Sujeito 2			Sujeito 3			Sujeito 4			Sujeito 5		
	Pré	Pós	Variação %	Pré	Pós	Variação %	Pré	Pós	Variação %	Pré	Pós	Variação %	Pré	Pós	Variação %
Score total	85	82	-4	73	65	-11	67	44	-34	61	49	-20	64	41	-36
Irritabilidade	9	8	-11	20	16	-20	19	12	-37	23	16	-30	14	10	-29
Letargia	27	28	4	23	21	-9	20	13	-35	8	6	-25	24	16	-33
Estereotipia	9	8	-11	10	10	0	6	3	-50	6	3	-50	4	2	-50
Hiperatividade	28	27	-4	20	18	-10	16	13	-19	18	18	0	15	10	-33
Fala inapropriada	12	11	-8	0	0	0	6	3	-50	6	6	0	7	3	-57

Tabela 4 – Exames laboratoriais.

Exames	Sujeito 1			Sujeito 2			Sujeito 3			Sujeito 4			Sujeito 5		
	Pré RSV	45 dias RSV	90 dias RSV	Pré RSV	45 dias RSV	90 dias RSV	Pré RSV	45 dias RSV	90 dias RSV	Pré RSV	45 dias RSV	90 dias RSV	Pré RSV	45 dias RSV	90 dias RSV
Hemoglobina	13,5	13,2	13,1	15,3	15,1	14,5	15,4	15,2	15,3	11,6	11,7	11,4	14,6	14,5	14,3
Hematócrito	38,3	37,5	36,9	44,8	44	43,1	43,8	43	42,8	35	35,4	35,1	42,8	42,6	42,1
Leucócitos	5710	6320	4620	5490	6700	5690	9810	8120	7620	9510	8910	8890	9000	11240	7290
Seg (%)	44,4	56,5	48,7	42,8	48,5	38,7	46,1	44,3	32,2	49,4	59,6	49,5	44,9	68,5	39
Linf (%)	37,7	27,7	33,1	40,8	35,1	45,5	36,7	37,7	43,6	39	28,1	39	42,3	20,1	48,4
Plaquetas	340000	304000	287000	237000	235000	216000	355000	303000	283000	302000	304000	324000	313000	295000	327000
DHL	250	190	180	234	195	178	224	169	158	171	181	183	180	155	151
Triglicérides	57	59	50	45	39	46	60	80	74	189	111	112	135	87	79
Colesterol Total	167	159	173	109	110	109	172	164	175	177	174	186	138	128	130
Colesterol HDL	53	49	53	47	49	50	57	61	57	39	40	42	31	34	25
Glicose	83	85	81	92	94	90	93	87	85	89	86	87	85	92	83
Creatinina	0,49	0,45	0,46	0,8	0,72	0,71	0,69	0,69	0,6	0,51	0,54	0,55	0,68	0,62	0,64
BT	0,5	0,3	0,5	0,4	0,4	0,7	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
BI	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
BD	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TGO	26	20	21	21	20	19	18	14	16	16	18	17	17	15	17
TGP	21	20	19	16	18	16	11	12	12	13	16	17	17	15	18
Amilase	55	59	56	59	55	54	94	92	87	46	38	42	26	26	25

Seg – segmentados; Linf – linfócitos; DHL – desidrogenase láctica; HDL - lipoproteína de alta densidade; BT – bilirrubina total; BI – bilirrubina indireta; BD – bilirrubina direta; TGO - transaminase glutâmico-oxalacética; TGP - transaminase glutâmico-pirúvico.

Figura 1. Expressão relativa de miRNA antes e depois do tratamento com RSV. As barras representam o Erro Padrão da Média. *P<0,05.



12 ARTIGO 2 - THE EFFECTS OF RESVERATROL TREATMENT ON PEDIATRIC SUBJECTS DIAGNOSED WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER – A PILOT STUDY.

The effects of resveratrol treatment on pediatric subjects diagnosed with autism spectrum disorder – a pilot study.

Josemar Marchezan^{1,2,3,4}, Iohanna Deckmann^{2,3,4,5}, Guilherme Cordenonsi da Fonseca^{2,3,4,6}, Rogerio Margis^{4,6}, Rudimar Riesgo^{1,2,4,7}, Carmem Gottfried^{2,3,4,5}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e Adolescente, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Grupo de Pesquisa Translacional do Transtorno do Espectro Autista-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação-INCT-NIM.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁶ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁷ Departamento de Pediatria, Unidade de Neurologia Infantil, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

ABSTRACT

Introduction: Autism spectrum disorder (ASD) is a condition that displays complex interactions among genetic and environmental risk factors, immunological and inflammatory alterations, redox imbalances, and modifications in synaptic connections throughout development. Resveratrol (RSV) is a plant-originated polyphenol present on grape peels and seeds, with important antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective properties. **Objectives:** To evaluate the efficacy and safety of RSV in pediatric subjects diagnosed with Autism Spectrum Disorder (ASD). **Methods:** In an open-label pilot clinical study, 200mg of RSV was administered daily, for 90 days, to five patients diagnosed with ASD. Outcomes were measured via clinical laboratory results, eight different microRNA expressions, and the *Aberrant Behavior Checklist*

(ABC) and *Clinical Global Impression – Improvement* (CGI-I) scale. **Results:** All participants were male, aged between 10 and 13 years old. Results demonstrated a significant reduction in the ABC total score ($P = 0.042$) and in the Irritability subscale ($P = 0.041$). The Stereotypical Behavior ($P = 0.066$), Hyperactivity ($P = 0.068$) and Lethargy/Social Withdrawal ($P = 0.078$) subscales demonstrated a slight reduction in score, albeit not significant. At the end of the 90-day trial period, as measured by the CGI-I scale, three (60%) of the five subjects demonstrated marked improvement; one subject demonstrated mild improvement, and one subject demonstrated no alterations in behavior. No adverse effects were observed, and RSV administration did not alter clinical laboratory results. Of the eight microRNAs evaluated, three (miR-124-3p, miR-125a-5p, and miR-195-5p) showed differences in expression before and after RSV treatment. **Conclusion:** Results of this pilot study suggest that RSV is safe for use in the pediatric population and may be useful in the treatment of ASD symptoms by altering the expression of microRNAs that modulate inflammatory responses.

Keywords: Resveratrol. Neuroinflammation. Inflammation. Autism. Autism spectrum disorder.

Introduction

Autism spectrum disorder is a neurodevelopmental disorder characterized by two principal behavioral components: 1) difficulty with communication and social interactions, and 2) restrictive and repetitive behaviors, interests and activities (ASSOCIATION, 2013). According to the *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), ASD is prevalent in 16,8 out of every 1000 children (1 in 59), affecting 26.6/1000 boys and 6,6/1000 girls. This prevalence represents an increase of approximately 150% between the years 2000 and 2014 (BAIO *et al.*, 2018).

The etiology of ASD has not yet been completely elucidated (GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018). The growing number of publications, especially in the last decade, however, leaves no doubt that it is a multifactorial disease which demonstrates a complex interaction among genetic, environmental and immune components (GOTTFRIED *et al.*, 2015).

Immune dysfunction has been a well-recognized characteristic among autism spectrum disorders for decades, and has been the focus of several recent publications (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA,

2014). Many suggest the possibility that the immune dysfunction present in ASD may serve as a pharmacological target, and that a subgroup of patients diagnosed with ASD may benefit from immune-based therapies (CAREAGA; VAN DE WATER; ASHWOOD, 2010; CHEZ; GUIDO-ESTRADA, 2010; GŁADYSZ; KRZYWDZIŃSKA; HOZYASZ, 2018; GOTTFRIED *et al.*, 2015; MASI *et al.*, 2015, 2017; MCDOUGLE *et al.*, 2015; MEAD; ASHWOOD, 2015; NORIEGA; SAVELKOUL, 2014; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

Resveratrol (RSV) is a simple molecule, initially isolated from the peruvian *Cassia quinquangulata* plant, during a search for new cancer preventing agents (JANG *et al.*, 1997). Polyphenols, especially *trans*-RSV, have received great attention from the scientific community as a result of several studies demonstrating its therapeutic role in a plethora of conditions, including cancer, type 2 diabetes, and cardiovascular and neurodegenerative diseases. It is possible that different mechanisms of action are involved, but the modulation of inflammatory processes is the common denominator of them all (VANG *et al.*, 2011).

Over the last years, studies employing pre- and/or post-natal administration of RSV in ASD animal models suggested that RSV may target ASD symptoms (including improving social behavior, reducing repetitive behavior and altering sensitivity) and lessen immune dysfunction (AHMAD *et al.*, 2018; BAKHEET *et al.*, 2016, 2017; BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2014; BHANDARI; KUHAD, 2017; FONTES-DUTRA *et al.*, 2018; HIRSCH *et al.*, 2018a; LI *et al.*, 2009).

Since the criteria for diagnosing ASD are clinical, via behavioral analysis, evaluating circulating microRNAs may serve as a biomarker tool. This analysis could be useful for the early diagnosis of ASD, for measuring the risk of developing ASD, for determining the prognosis of ASD, and for the characterization of specific subgroups that may or may not respond well to certain treatment modalities (ANDERSON, 2015; GOLDANI *et al.*, 2014; ZWAIGENBAUM; PENNER, 2018). MicroRNAs (miRNA) are small (19-25 nucleotides) non-coding RNAs that regulate the translation of messenger RNA into their respective proteins, controlling several different cellular processes (AMBROS, 2004). Altered levels of specific miRNAs have been shown to be involved in a plethora of central nervous system disorders (DE SMAELE; FERRETTI; GULINO, 2010; SAUGSTAD, 2010), however few studies have demonstrated the role of miRNA in ASD (KAMAL; MUSHTAQ; GREIG, 2015).

In the present study, RSV was administered to children diagnosed with ASD in order to evaluate its possible therapeutic effects, tolerability, and safety. Effects of RSV on the expression of eight different miRNAs was also evaluated.

Methods

Study Design and Logistics

This is an open-label pilot clinical study designed to evaluate the efficacy and tolerability of administering 200mg/day RSV to pediatric patients diagnosed with ASD. The study took place from October 2017 until January 2018. Subjects were recruited in the outpatient ASD clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and scales and biological samples were applied and collected at the Clinical Studies Center (Centro de Pesquisas Clínicas) of the same hospital. Laboratory analysis were carried out at the Basic Clinical Laboratory (Laboratório de Análises Clínicas) of the HCPA and microRNA expression was evaluated at the Neuroglial Plasticity Laboratory (Laboratório de Plasticidade Neuroglial) of the Biochemistry Department of the Federal University of Rio Grande do Sul (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil).

Subjects

Five male patients aged 10-18 years, diagnosed with ASD according to the criteria described in the fifth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V) (ASSOCIATION, 2013), were included in the study.

Psychotropic medication was allowed as long as all subjects were utilizing the same dose for at least four weeks before entering the study, and as long as no dose adjustments were necessary throughout the study period.

Subjects were excluded from the study if they presented with any of the following criteria: 1) Other diseases whose clinical presentation is similar to autism, such as Fragile X Syndrome, Rett Syndrome, Angelman Syndrome, Prader-Willi Syndrome, Smith-Lemli-Opitz Syndrome and Tuberous Sclerosis complex; 2) Dose adjustment or interruption of any psychotropic medication during the study; 3) Use of anti-seizure medication; 4) Other active systemic diseases such as cardiovascular, liver or kidney pathologies; 5) Any other condition in which the administration of 200mg RSV was

deemed not safe by the principal investigator.

Intervention

Subjects received 200mg RSV daily (two 100mg capsules as a single morning dose) for 90 days. The RSV employed in this study presented adequate purity for use in clinical trials (99% *trans*-RSV, Farmácia Reativa, Porto Alegre, RS).

Response measures

ASD symptoms were evaluated via the *Aberrant Behavior Checklist* (AMAN *et al.*, 1985; LOSAPIO *et al.*, 2011) and the *Clinical Global Impression – Improvement*, CGI-I) scale (GUY W, 1976) before and after 90 days of treatment with RSV.

In order to evaluate the adverse effects of RSV, if any, peripheral blood was collected for clinical laboratory exams before, 45 days, and 90 days after use of 200mg RSV daily. The following clinical laboratory exams were performed, soon after peripheral phlebotomy: complete blood count, platelet count, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), amylase, total, direct and indirect bilirubin, blood glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, lactate dehydrogenase and creatinine.

The expression levels of 8 different miRNAs (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p) with proven roles in neural plasticity and the immune system were also evaluated before and after treatment.

microRNA extraction

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested from 5mL peripheral blood obtained via phlebotomy. Blood was collected into a blood collection tube

containing EDTA and submitted to density gradient centrifugation (Histopaque 1,077 g/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri), according to the manufacturer's instructions, for PBMC isolation.

Whole blood was centrifuged at 1200 rpm for 15 minutes at room temperature. Plasma was separated and immediately added to TRIzol® (1:2). The remaining blood components were then resuspended in enough phosphate buffered saline (PBS) to restore the initial whole blood volume. This was then placed over Histopaque-1077 and centrifuged at 400 g for 30 minutes at room temperature. Lymphocytes and other mononuclear cells remained at the plasma/Histopaque-1077 interface. These were aspirated, placed in a conical tube, washed with PBS and centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes at 4°C. The pellet containing all cells was resuspended in PBS. Part of the cells were then prepared with Trypan Blue (1:1) for manual counting in a hemocytometer, while the remaining cells were stored in TRIzol®.

RNA Extraction, Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA from the plasma samples was isolated using QIAzol® (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was undertaken according to Chen and collaborators (CHEN *et al.*, 2005). Briefly, 1.25 mM stem-loop primers for each miRNA (U6, RNU6, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p) were added to a mix containing RNA, oligo(dT)25V (5 mM), 250 mM dNTPs (Ludwig, RS, Porto Alegre, Brazil) and RNase-free water in a final volume of 17 µL. This was submitted to an incubation step at 65°C for 5 minutes, and then placed on ice. The MML-V RT enzyme (New England Biolabs, MA, USA) was used for cDNA synthesis according to the manufacturer's instructions. Each reaction mix was incubated at 16°C for 30 minutes followed by another 30 minutes at 42°C. All cDNA samples were diluted 50 X in RNase-free water. Stem loop primers, initiation primers and the universal reverse primer were designed according to Chen and collaborators (CHEN *et al.*, 2005).

Real-time PCR was performed in a Bio-Rad CFX384 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizing SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR reaction

took place in a total volume of 10 μ L containing 5 μ L of diluted cDNA (1:50), 1 X SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.1 mM dNTPs, 1 X Buffer, 3 mM MgCl₂, 0.25 U Taq DNA polymerase (Quatro G, Porto Alegre, RS, Brazil) and 200 nM of each forward and reverse primer. Samples were analyzed in triplicates in a 384-well plate, in which a control was also included. Reference genes were chosen according to the GeNorm software, in order to determine the necessary miRNAs for normalization and to identify the most stable miRNAs to be used as normalizers. In order to determine miRNA amplification, PCR was set up as follows: an initial 5-minute step at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C for denaturation, 10 seconds at 60°C for annealing and 10 seconds at 72°C for elongation. Melting curve analysis was programmed at the end of the PCR reaction at the 65°C and 95°C interval, with readings at every 0.4°C increase in temperature. Baselines and limits were determined manually using the Bio-Rad CFX software. To calculate relative miRNA expression, the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) method was employed. Student's t test was performed to compare the differences in expression among samples. Means were considered significantly different when $P < 0.05$.

Ethical considerations

This study protocol was approved by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa) of the HCPA, under number 17-0132 (CAAE 65862917100005327). Each subject's parent or guardian signed an informed consent declaration.

Statistical Analysis

Given that this is a pilot study designed for proof of concept and given that there were no safety data regarding the use of RSV in children, a limited number of subjects were included, without calculating sample size.

Data was entered in an Excel data sheet and afterwards uploaded to the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) program, v. 21.0, where data was processed and analyzed.

For the descriptive analysis, quantitative variables were described using mean and standard deviation, and qualitative variables were described using absolute and

relative frequencies.

Mean values obtained from the ABC scale were compared amongst each other using the Wilcoxon t test; Cohen's d formula was employed for effect size, corrected for $n < 50$.

When comparing miRNA expression values, a baseline value was included for each reference gene in each sample (HIRSCH *et al.*, 2018b). P values ≤ 0.05 were considered statistically significant. The Student's t-test was performed to compare the differences in expression among the different samples. P values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

The study sample consisted of five boys aged 10 to 13 years, with a mean of 11.8 (± 1.1) years of age. Two patients presented normal intelligence (subjects 3 and 5), according to IQ and psychometric tests; the remaining patients presented mild intellectual impairment (subject 4) and moderate intellectual impairment (subjects 1 and 2). Three patients (subjects 3, 4, and 5) demonstrated preserved verbal communication; one patient (subject 1) communicated using short phrases only, and one patient (subject 2) presented echolalic speech. Two patients (40%) used psychotropic medication (sertraline and aripiprazole). All patients made use of at least one non-drug treatment. Patient characteristics are summarized in Table 1.

At the end of the 90-day treatment, three out of five (60%) patients presented improvement, one patient presented mild improvement and one patient presented no improvement, as measured by the CGI-I scale.

Comparing the ABC scale score means, there was a reduction in total score and in all subscale scores, where total score and the Irritability subscale score presented statistically significant differences (Table 2). Table 3 shows total and subscale scores for each patient, before and after RSV treatment.

Of the eight miRNAs tested in PBMCs, the GeNorm algorithm classified 21-5p, 30c-5p, and 191-5p as being the most stable. Therefore, these were used as normalizers when evaluating relative expression of the remaining miRNAs. Of the five remaining miRNAs, three miRNAs (miR-124-3p, miR-125a-5p, and miR-195-5p) presented a statistically significant increase in relative expression after 90 days of RSV treatment ($P = 0.021$, $P = 0.036$, and $P = 1,61515E^{-07}$, respectively; Figure 1).

All patients tolerated RSV well, and none presented adverse effects. All patients completed the study. There were no alterations in clinical laboratory results during the 90-day treatment period, as demonstrated in Table 4.

Discussion

To this date, there are no available treatments that completely revert ASD's main symptoms (BENVENUTO *et al.*, 2013; EISSA *et al.*, 2018). Only two medications, risperidone and aripiprazole, are approved by the *Food and Drug Administration* (FDA) for the treatment of disruptive symptoms in ASD patients (EISSA *et al.*, 2018; SHARMA; GONDA; TARAIZI, 2018). However, these are associated with metabolic adverse effects, such as weight gain, dyslipidemia and hyperglycemia (YOUNG; FINDLING, 2015). Individual impairment, which affects many aspects of everyday functions (MASI *et al.*, 2017), the direct and indirect economic burden of treatments, and the impact on family suffering strengthens the need for effective interventions in ASD (BUESCHER *et al.*, 2014; KARST; VAN HECKE, 2012; MARCHEZAN *et al.*, 2017; SMITH; GREENBERG; MAILICK, 2014; WEISS *et al.*, 2012).

To our knowledge, this is the first study using RSV in children and in patients diagnosed with ASD. Similar to what has been observed in animal models, our study suggests that RSV may reduce ASD symptoms. We verified that, after three months of RSV use, three patients showed improvement and one patient showed mild improvement, according to the CGI-I scale. There was also a reduction in all ABC scale scores, with the total score and the Irritability subscale score being statistically significant.

The Lethargy/Social Withdrawal, Stereotypic Behavior, and Hyperactivity/Noncompliance domains demonstrated mild improvement, with $P < 0.1$. Possibly, these findings would have been significant in a larger sample size. The best responders were those patients with normal intelligence (subjects 3 and 5), which suggests that RSV may be more effective in patients with preserved cognitive abilities.

In our sample, 60% of the patients had normal speech patterns, while 20% did not show effective communication skills, which may justify their poor response in the Inappropriate Speech domain.

RSV was well tolerated, and there were no observed adverse effects. Previous studies in adults reported mild adverse reactions which were self-limiting, especially in

doses above 500 mg/day (ALMEIDA *et al.*, 2009; ELLIOTT *et al.*, 2009; HEEBØLL *et al.*, 2016; LA PORTE *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2014); no side effects were reported when doses below 500 mg/day were employed (BEDADA; NEERATI, 2016; FAGHIHZADEH; ADIBI; HEKMATDOOST, 2015; LIN; SUN; LIN, 2016; MACEDO *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2010; POLLEY *et al.*, 2016; THAZHATH *et al.*, 2016; TURNER *et al.*, 2015; WONG *et al.*, 2011, 2013; ZORTEA *et al.*, 2016). Other studies in adults described hematologic alterations and an increase in cholesterol; in our study, no effects were observed after 45 and 90 days of RSV use (BO *et al.*, 2016; HEEBØLL *et al.*, 2016; VODUC *et al.*, 2014).

After RSV treatment, there was an increase in the expression of miR-124-3p, miR-125a-5p, and miR-195-5p miRNAs. A recent study published by our group did not find differences in the expression levels of these three miRNAs in ASD patients when compared to control patients (HIRSCH *et al.*, 2018c). However, other studies found that miR-195-5p is overexpressed in the lymphocytes and serum of children diagnosed with ASD (MUNDALIL VASU *et al.*, 2014; SARACHANA *et al.*, 2010). Moreover, our group reported that RSV is able to modify miRNA expression in an ASD animal model (HIRSCH *et al.*, 2018a).

All miRNAs whose expression levels were altered after RSV treatment play a role in inflammation. Studies using animal models and with human subjects demonstrated that both the central and peripheral immune system are altered in ASD. These alterations include, but are not limited to, immune activation, self-antibody formation, cytokine/chemokine imbalance, and an increase in the permeability of the blood-brain barrier (GOTTFRIED *et al.*, 2015).

miR-124 is known for being highly expressed in neurons, and is associated with neuronal differentiation (MAKEYEV *et al.*, 2007; MISHIMA *et al.*, 2007). In brain and spinal cord injury models, an increase in miR-124-3p has an inhibitory effect in neuroinflammation via decreased expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6, and increased expression of IL-10. miR-124 also downregulates the mTOR pathway, which is involved in the inflammatory response and has been associated with tuberous sclerosis and ASD (HASBANI; CRINO, 2018; HUANG *et al.*, 2018; LOUW *et al.*, 2016; ONORE *et al.*, 2017; WINDEN; EBRAHIMI-FAKHARI; SAHIN, 2018). Interestingly, RSV has beneficial effects in spinal cord injury models by inhibiting the mTOR pathway (ZHOU *et al.*, 2018).

miR-125a-5p downregulates the expression of the CCL5 chemokine via the Kruppel-like 13 (KLF13) pathway in activated T cells, and this effect seems to play a role in autoimmune events involved in systemic lupus erythematosus (WANG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2010). Its overexpression has a negative effect on the regulation of the NF κ B pathway, (KIM *et al.*, 2012), and has an important role in the suppression of macrophage activation (BANERJEE *et al.*, 2013; GRAFF *et al.*, 2012). In Graves' disease, of autoimmune etiology, miR-125a expression in PBMCs is reduced (INOUE *et al.*, 2014).

miR-195 is associated with inhibition of the pro-inflammatory activation of macrophages, significantly reducing the concentration of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α (BRAS *et al.*, 2017). It also inhibits the inflammatory process via inhibition of the TNF- α /NF- κ B and VEGF/PI3K/Akt pathways (MA *et al.*, 2018).

Even though we observed an improvement in ASD symptoms with RSV use, the small sample size and the fact that this was an open label study, in which potential placebo effects resulting from the families' high expectation for improvement render it impossible to conclude whether RSV is beneficial for children diagnosed with ASD. However, one may conclude that RSV may be safe for use in the pediatric population, may diminish SAD symptoms and alter the expression levels of miR-124-3p, miR-125a-5p, and miR-195-5p, which play a role in inflammatory responses.

Conclusion

Regardless of the small sample size, the results of this pilot study suggest that use of RSV in children is safe and may be beneficial in controlling ASD symptoms. RSV also increased expression of miR-124-3p, miR-125a-5p, and miR-195-5p, all of which play a role in inflammatory responses. New placebo-controlled clinical trials are necessary to fully evaluate the safety and therapeutic potential of RSV in children diagnosed with ASD. The role of miR-124-3p, miR-125a-5p and miR-195-5p, as well as other miRNAs, in the etiology and pathogenesis of ASD should be further explored.

Acknowledgements

We would like to thank the HCPA Research and Events Investment Fund (Fundo de Investimento em Pesquisas e Eventos; FIPE-HCPA), the Graduate

Program in Child and Adolescent Health of the UFRGS Medical School (Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Faculdade de Medicina - UFRGS), and the Autism Spectrum Disorder Translational Research Group (Grupo de Pesquisas Translacionais em Transtorno do Espectro Autista - GETTEA- UFRGS).

References

AHMAD, S. F. *et al.* Resveratrol Improves Neuroimmune Dysregulation Through the Inhibition of Neuronal Toll-Like Receptors and COX-2 Signaling in BTBR T+ Itpr3tf/J Mice. **NeuroMolecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 133–146, 21 mar. 2018.

ALMEIDA, L. *et al.* Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53 Suppl 1, p. S7-15, maio 2009.

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

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350–5, 16 set. 2004.

ANDERSON, G. M. Autism Biomarkers: Challenges, Pitfalls and Possibilities. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, n. 4, p. 1103–1113, 6 abr. 2015.

ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)**. [s.l.] American Psychiatric Pub, 2013.

BAIO, J. *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 67, n. 6, p. 1–23, 27 abr. 2018.

BAKHEET, S. A. *et al.* Resveratrol treatment attenuates chemokine receptor expression in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 77, p. 1–10, 2016.

BAKHEET, S. A. *et al.* Resveratrol Ameliorates Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T Regulatory Cell-Related Transcription Factor Signaling in a BTBR T + tf/J Mouse Model of Autism. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5201–5212, 2017.

BAMBINI-JUNIOR, V. *et al.* Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, v. 583, p. 176–181, 2014.

BEDADA, S. K.; NEERATI, P. Resveratrol Pretreatment Affects CYP2E1 Activity of Chlorzoxazone in Healthy Human Volunteers. **Phytotherapy research: PTR**, v. 30, n. 3, p. 463–468, mar. 2016.

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

BHANDARI, R.; KUHAD, A. Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. **Neurochemistry International**, v. 103, p. 8–23, 2017.

BO, S. *et al.* Six months of resveratrol supplementation has no measurable effect in type 2 diabetic patients. A randomized, double blind, placebo-controlled trial. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 896–905, set. 2016.

BUESCHER, A. V. S. *et al.* Costs of Autism Spectrum Disorders in the United Kingdom and the United States. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 721, 1 ago. 2014.

CAREAGA, M.; VAN DE WATER, J.; ASHWOOD, P. Immune dysfunction in autism: a pathway to treatment. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 7, n. 3, p. 283–292, 2010.

CHEN, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e179–e179, 27 nov. 2005.

CHEZ, M. G.; GUIDO-ESTRADA, N. Immune therapy in autism: historical experience and future directions with immunomodulatory therapy. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, v. 7, n. 3, p. 293–301, 2010.

DE SMAELE, E.; FERRETTI, E.; GULINO, A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. **Brain research**, v. 1338, p. 100–11, 18 jun. 2010.

EISSA, N. *et al.* Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 304, 16 maio 2018.

ELLIOTT, P. J. *et al.* Resveratrol/SRT-501. **Drugs of the Future**, v. 34, n. 4, p. 291, 2009.

FAGHIHZADEH, F.; ADIBI, P.; HEKMATDOOST, A. The effects of resveratrol supplementation on cardiovascular risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **The British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 5, p. 796–803, set. 2015.

FONTES-DUTRA, M. *et al.* Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 10, p. 9, 22 maio 2018.

GLADYSZ, D.; KRZYWDZIŃSKA, A.; HOZYASZ, K. K. Immune Abnormalities in Autism Spectrum Disorder-Could They Hold Promise for Causative Treatment? **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6387–6435, jan. 2018.

GOLDANI, A. A. S. *et al.* Biomarkers in autism. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 100, 12 ago. 2014.

GOTTFRIED, C. *et al.* The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, p. 121, 2015.

GUY W. **ECDEU assessment manual for psychopharmacology**: Guy, William : **Free Download, Borrow, and Streaming: Internet Archive**. Disponível em: <<https://archive.org/details/ecdeuassessmentm1933guyw>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

HASBANI, D. M.; CRINO, P. B. Tuberous sclerosis complex. In: **Handbook of clinical neurology**. [s.l: s.n.]. v. 148p. 813–822.

HEEBØLL, S. *et al.* Placebo-controlled, randomised clinical trial: high-dose resveratrol treatment for non-alcoholic fatty liver disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 4, p. 456–464, 2016.

HIRSCH, M. M. *et al.* Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 336–343, maio 2018a.

HIRSCH, M. M. *et al.* Sex Differences and Estrous Cycle Changes in Synaptic Plasticity-related microRNA in the Rat Medial Amygdala. **Neuroscience**, v. 379, p. 405–414, 21 maio 2018b.

HIRSCH, M. M. *et al.* Data on social transmission of food preference in a model of autism induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Data in brief**, v. 18, p. 1433–1440, jun. 2018c.

HUANG, S. *et al.* Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 32, n. 1, p. 512–528, jan. 2018.

KAMAL, M. A.; MUSHTAQ, G.; GREIG, N. H. Current Update on Synopsis of miRNA Dysregulation in Neurological Disorders. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 14, n. 4, p. 492–501, 2015.

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

LA PORTE, C. *et al.* Steady-State pharmacokinetics and tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 7, p. 449–454, jul. 2010.

LI, X. *et al.* Elevated immune response in the brain of autistic patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 207, n. 1–2, p. 111–116, fev. 2009.

LIN, C.-T.; SUN, X.-Y.; LIN, A.-X. Supplementation with high-dose trans-resveratrol improves ultrafiltration in peritoneal dialysis patients: a prospective, randomized, double-blind study. **Renal Failure**, v. 38, n. 2, p. 214–221, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

LOSAPIO, M. F. *et al.* [Partial cross-cultural adaptation of the Aberrant Behavior Checklist (ABC) scale for analysis of patients with mental retardation]. **Cadernos De Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 909–923, maio 2011.

LOUW, A. M. *et al.* Chitosan polyplex mediated delivery of miRNA-124 reduces activation of microglial cells in vitro and in rat models of spinal cord injury. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 12, n. 3, p. 643–653, abr. 2016.

MACEDO, R. C. S. *et al.* Effects of chronic resveratrol supplementation in military firefighters undergo a physical fitness test—a placebo-controlled, double blind study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 89–95, fev. 2015.

- MAKEYEV, E. V *et al.* The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. **Molecular cell**, v. 27, n. 3, p. 435–48, 3 ago. 2007.
- MARCHEZAN, J. *et al.* A Placebo-Controlled Crossover Trial of Gastrin-Releasing Peptide in Childhood Autism. **Clinical Neuropharmacology**, v. 40, n. 3, p. 108–112, 2017.
- MASI, A. *et al.* Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 440–446, 2015.
- MASI, A. *et al.* The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 194–204, 2017.
- MCDOUGLE, C. J. *et al.* Toward an immune-mediated subtype of autism spectrum disorder. **Brain Research**, v. 1617, p. 72–92, 2015.
- MEAD, J.; ASHWOOD, P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 49–55, 2015.
- MISHIMA, T. *et al.* RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS. **Brain research**, v. 1131, n. 1, p. 37–43, 2 fev. 2007.
- MUNDALIL VASU, M. *et al.* Serum microRNA profiles in children with autism. **Molecular Autism**, v. 5, p. 40, 2014.
- NORIEGA, D. B.; SAVELKOUL, H. F. J. Immune dysregulation in autism spectrum disorder. **European Journal of Pediatrics**, v. 173, n. 1, p. 33–43, 2014.
- ONORE, C. *et al.* Dynamic Akt/mTOR Signaling in Children with Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, p. 43, 15 mar. 2017.
- PATEL, K. R. *et al.* Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. **Cancer Research**, v. 70, n. 19, p. 7392–7399, out. 2010.
- POLLEY, K. R. *et al.* Influence of exercise training with resveratrol supplementation on skeletal muscle mitochondrial capacity. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 41, n. 1, p. 26–32, jan. 2016.
- SARACHANA, T. *et al.* Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. **Genome Medicine**, v. 2, n. 4, p. 23, 2010.
- SAUGSTAD, J. A. MicroRNAs as Effectors of Brain Function with Roles in Ischemia and Injury, Neuroprotection, and Neurodegeneration. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 9, p. 1564–1576, 7 set. 2010.
- SMITH, L. E.; GREENBERG, J. S.; MAILICK, M. R. The family context of autism spectrum disorders: influence on the behavioral phenotype and quality of life. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 143–155, 2014.
- THAZHATH, S. S. *et al.* Administration of resveratrol for 5 wk has no effect on glucagon-like peptide 1 secretion, gastric emptying, or glycemic control in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 103, n. 1, p. 66–70, jan. 2016.
- TURNER, R. S. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. **Neurology**, v. 85, n. 16, p. 1383–1391, out. 2015.

VERKHRATSKY, A.; RODRÍGUEZ, J. J.; PARPURA, V. Neuroglia in ageing and disease. **Cell and Tissue Research**, v. 357, n. 2, p. 493–503, 2014.

VODUC, N. *et al.* Effect of resveratrol on exercise capacity: a randomized placebo-controlled crossover pilot study. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 10, p. 1183–1187, out. 2014.

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

WINDEN, K. D.; EBRAHIMI-FAKHARI, D.; SAHIN, M. Abnormal mTOR Activation in Autism. **Annual Review of Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. annurev-neuro-080317-061747, 9 jul. 2018.

WONG, R. H. X. *et al.* Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 21, n. 11, p. 851–856, nov. 2011.

WONG, R. H. X. *et al.* Chronic resveratrol consumption improves brachial flow-mediated dilatation in healthy obese adults. **Journal of Hypertension**, v. 31, n. 9, p. 1819–1827, set. 2013.

ZHOU, J. *et al.* Beneficial Effects of Resveratrol-Mediated Inhibition of the mTOR Pathway in Spinal Cord Injury. **Neural plasticity**, v. 2018, p. 7513748, 2018.

ZORTEA, K. *et al.* Resveratrol Supplementation in Schizophrenia Patients: A Randomized Clinical Trial Evaluating Serum Glucose and Cardiovascular Risk Factors. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 73, jan. 2016.

ZWAIGENBAUM, L.; PENNER, M. Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. k1674, 21 maio 2018.

Table 1 – Patient Characteristics.

Subject	Age	IQ	CGI-I	Exams	Therapies	Medications
1	12	II mod	Moderately III	AEP, EEG, Cariotype, Fragile X, and NMR normal	Psych, Phono, OT, school	None
2	12	II mod	Severely III	Audiometry, EEG, Cariotype, Fragile X, and NMR normal	Phono, school	None
3	13	133	Moderately III	Cariotype, Fragile X, and EEG normal	Psychopedagogy, musical therapy, school	None
4	10	II mild	Moderately III	EEG, Cariotype, Fragile X, and NMR normal	Psych, Phono, OT, school	Sertraline e Aripiprazole
5	12	120	Moderately III	Focal paroxysmal EEG	Psych, psychopedagogy, school	Sertraline

ID – intellectual impairment; Mod – moderate; AEP – auditory evoked potential; EEG – electroencephalography; NMR – nuclear magnetic resonance; Psych – psychology; Phono – phonoaudiology; OT –occupational therapy.

Table 2. Mean *Aberrant Behavior Checklist* scores before and after treatment with Resveratrol.

Subscale/Domain	Pre-RSV	Post-RSV	<i>P</i>	Effect Size
Total score	70.0± 9.48	56.2 ±17.1	0.042	0.561
Irritability	17.0± 5.52	12.4± 3.57	0.041	0.557
Lethargy/Social Withdrawal	20.4±7.36	16.8±8.28	0.078	0.259
Stereotypic Behavior	7.00±2.44	5.20±3.56	0.066	0.332
Hyperactivity	19.40±5.17	17.20±6.45	0.068	0.212
Inappropriate Speech	6.20±4.26	4.60±4.15	0.109	0.214

*Mean±SD

Table 3 – Individual *Aberrant Behavior Checklist* scores before and after treatment with Resveratrol.

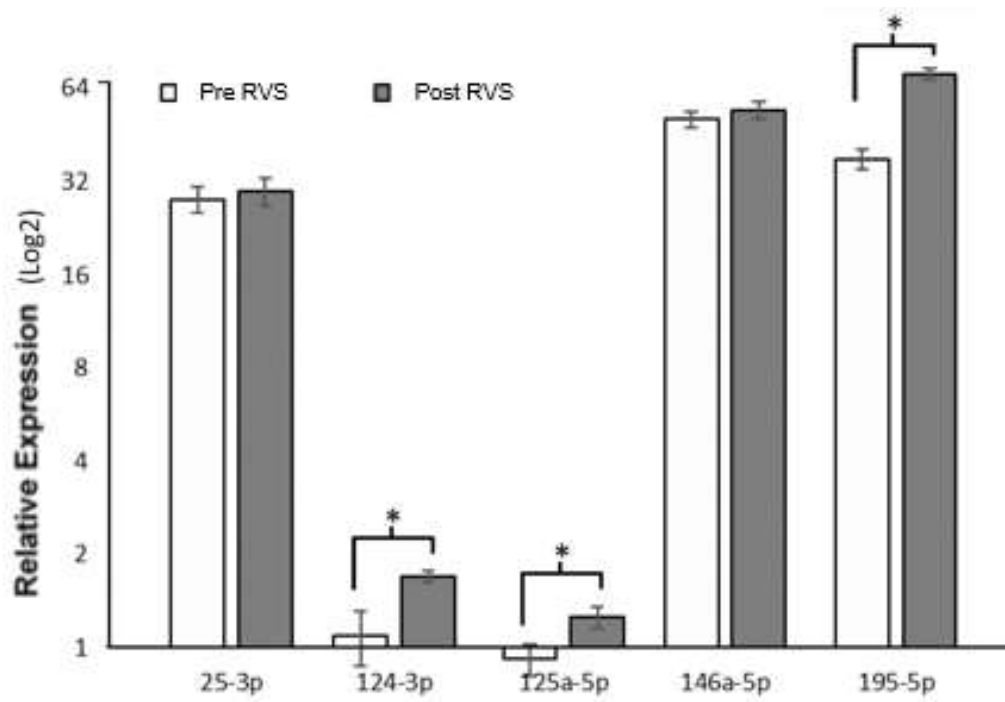
ABC Scale	Subject 1			Subject 2			Subject 3			Subject 4			Subject 5		
	Pre	Post	% Variation	Pre	Post	% Variation	Pre	Post	% Variation	Pre	Post	% Variation	Pre	Post	% Variation
Total score	85	82	-4	73	65	-11	67	44	-34	61	49	-20	64	41	-36
Irritability	9	8	-11	20	16	-20	19	12	-37	23	16	-30	14	10	-29
Lethargy	27	28	4	23	21	-9	20	13	-35	8	6	-25	24	16	-33
Stereotypic behavior	9	8	-11	10	10	0	6	3	-50	6	3	-50	4	2	-50
Hyperactivity	28	27	-4	20	18	-10	16	13	-19	18	18	0	15	10	-33
Inappropriate speech	12	11	-8	0	0	0	6	3	-50	6	6	0	7	3	-57

Table 4 – Laboratory Exams.

Exams	Subject 1			Subject 2			Subject 3			Subject 4			Subject 5		
	Pre RSV	45 days RSV	90 days RSV	Pre RSV	45 days RSV	90 days RSV	Pre RSV	45 days RSV	90 days RSV	Pre RSV	45 days RSV	90 days RSV	Pre RSV	45 days RSV	90 days RSV
Hemoglobin	13.5	13.2	13.1	15.3	15.1	14.5	15.4	15.2	15.3	11.6	11.7	11.4	14.6	14.5	14.3
Hematocrit	38.3	37.5	36.9	44.8	44.0	43.1	43.8	43.0	42.8	35.0	35.4	35.1	42.8	42.6	42.1
Leukocytes	5710	6320	4620	5490	6700	5690	9810	8120	7620	9510	8910	8890	9000	11240	7290
Segmented (%)	44.4	56.5	48.7	42.8	48.5	38.7	46.1	44.3	32.2	49.4	59.6	49.5	44.9	68.5	39.0
Lymphocytes (%)	37.7	27.7	33.1	40.8	35.1	45.5	36.7	37.7	43.6	39.0	28.1	39.0	42.3	20.1	48.4
Platelets	340000	304000	287000	237000	235000	216000	355000	303000	283000	302000	304000	324000	313000	295000	327000
LDH	250	190	180	234	195	178	224	169	158	171	181	183	180	155	151
Triglycerides	57	59	50	45	39	46	60	80	74	189	111	112	135	87	79
Total Cholesterol	167	159	173	109	110	109	172	164	175	177	174	186	138	128	130
HDL Cholesterol	53	49	53	47	49	50	57	61	57	39	40	42	31	34	25
Glucose	83	85	81	92	94	90	93	87	85	89	86	87	85	92	83
Creatinine	0.49	0.45	0.46	0.8	0.72	0.71	0.69	0.69	0.6	0.51	0.54	0.55	0.68	0.62	0.64
TB	0.5	0.3	0.5	0.4	0.4	0.7	0.3	0.4	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
IB	0.4	0.2	0.3	0.3	0.2	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DB	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
AST	26	20	21	21	20	19	18	14	16	16	18	17	17	15	17
ALT	21	20	19	16	18	16	11	12	12	13	16	17	17	15	18
Amylase	55	59	56	59	55	54	94	92	87	46	38	42	26	26	25

LDH – lactate dehydrogenase; HDL – high density lipoprotein; TB – total bilirubin; IB –indirect bilirubin; DB – direct bilirubin; AST – aspartate aminotransferase; ALT – alanine aminotransferase

Figure 1. Relative miRNA expression before and after treatment with RSV. Bars represent mean \pm standard error. * $P < 0.05$.



13 ARTIGO 3 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNA EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.

Avaliação da expressão de microRNA em sujeitos pediátricos com transtorno do espectro autista.

Josemar Marchezan^{1,2,3,4}, Iohanna Deckmann^{2,3,4,5}, Guilherme Cordenonsi da Fonseca^{2,3,4,5}, Giovanna Carello-Collar^{2,3,4}, Mauro M. Hirsch^{2,3,4,6}, Rogerio Margis^{2,5}, Carmem Gottfried^{2,3,4,6}, Rudimar Riesgo^{1,2,4,7}.

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e Adolescente, Escola de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Grupo de Pesquisa Translacional do Transtorno do Espectro Autista-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação-INCT-NIM.

⁵Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁶Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁷Departamento de Pediatria, Unidade de Neurologia Infantil, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio do desenvolvimento neurológico caracterizado por alterações na comunicação, interação social e padrões restritos e repetitivos de comportamento. Atualmente, o diagnóstico se dá exclusivamente por avaliação comportamental, uma vez que não existe um marcador biológico. Numerosos biomarcadores têm sido propostos para o TEA como potenciais ferramentas para predição de diagnóstico e terapias. Dessa forma, os microRNA se apresentam como excelentes candidatos para estudos de biomarcadores, possuindo estabilidade e resistência à degradação. No presente estudo, foi avaliada a expressão de um conjunto de 18 microRNA na saliva tanto de sujeitos pediátricos com TEA quanto com desenvolvimento típico. Foi possível isolar o miR-191 a partir das amostras de saliva e verificar aumento na

expressão nos pacientes com TEA. O miR-191 está envolvido com sistema imune, maturidade cortical e remodelação duradoura da coluna associada à depressão sináptica de longa duração. Dessa forma, esse miR-191 pode estar envolvido no desbalanço destas vias no TEA. Uma vez que a saliva é um fluido biológico de acesso fácil e não invasivo, encorajamos novas pesquisas para isolamento de microRNA na saliva visando uso futuro como biomarcadores, bem como busca por alvos farmacológicos.

Palavras chave: TEA, autismo, inflamação, microRNA, biomarcador

Introdução

O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio do desenvolvimento neurológico caracterizado por déficits na comunicação, interação social e padrões restritos e repetitivos de comportamento (ASSOCIATION, 2013). Do ano de 2000 até 2014 houve um aumento de sua prevalência em 150% e atualmente o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estima uma prevalência de TEA em 16,8 por 1000 crianças (BAIO *et al.*, 2018). Apesar dos avanços no conhecimento sobre o transtorno, seu diagnóstico permanece clínico (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; GOLDANI *et al.*, 2014; SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018). Numerosos biomarcadores têm sido propostos para o TEA, incluindo marcadores bioquímicos, morfológicos, imunológicos, hormonais, neurofisiológicos, neuroanatômicos e neuropsicológicos (AHMAD *et al.*, 2017; FULCERI *et al.*, 2018; HEUNIS; ALDRICH; DE VRIES, 2016; INGA JÁCOME *et al.*, 2016; LI; KARNATH; XU, 2017; MASI *et al.*, 2017; RUGGERI *et al.*, 2014), pois poderiam auxiliar no diagnóstico precoce, na mensuração de risco de desenvolvimento do TEA, na avaliação do prognóstico, na caracterização de subgrupos de pacientes e na definição de subconjuntos de indivíduos que responderiam mais favoravelmente a tratamentos específicos (ANDERSON, 2015; GOLDANI *et al.*, 2014; ZWAIGENBAUM; PENNER, 2018).

Dentre as propostas moleculares de marcadores biológicos, destacam-se os microRNA. MicroRNA (miRNA) são um grupo de pequenos RNA não-codificantes com cerca de 22 nucleotídeos, cuja alterações têm sido implicados em várias desordens neuropsiquiátricas (BELZEAUX; LIN; TURECKI, 2017; GEAGHAN; CAIRNS, 2015; HOSS *et al.*, 2014; QIU; TAN; ZENG, 2015; YIN *et al.*, 2014). Especialmente no TEA, estudos em humanos tem encontrado diferença na expressão de miRNA em relação à controles no córtex cerebelar (ABU-ELNEEL *et al.*, 2008), cérebro (MOR *et al.*, 2015),

linfócitos (SARACHANA *et al.*, 2010; TALEBIZADEH; BUTLER; THEODORO, 2008), soro (KICHUKOVA *et al.*, 2017; MUNDALIL VASU *et al.*, 2014), sangue (HIRSCH *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2015) e saliva (HICKS *et al.*, 2016).

O uso de perfis de miRNA como biomarcadores tem recebido atenção significativa nos últimos anos (BLANDFORD; GALLOWAY; MOORE, 2018), pois apresentam notável estabilidade e resistência à degradação, especialmente em comparação com RNA mensageiro (KICHUKOVA *et al.*, 2017); são estáveis em diferentes fluidos corporais; estão envolvidos na patogênese das doenças; e a detecção pode ser realizada no início da doença (STOICEA *et al.*, 2016). No presente estudo, foi avaliada a expressão de um conjunto de miRNA a partir da saliva de sujeitos pediátricos com TEA e respectivos controles com desenvolvimento normal.

Métodos

Sujeitos

Os indivíduos foram recrutados no ambulatório de Transtorno do Espectro Autista da Unidade de Neuropediatria do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) para os casos e da Ambulatório de Pediatria e Cirurgia Pediátrica para os controles, após autorização dos pais e/ou responsáveis através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA: 16-0567).

Para o grupo controle, foram selecionados indivíduos com desenvolvimento compatível com a idade cronológica, sem patologias que pudessem gerar distúrbios do comportamento e na mesma faixa etária dos pacientes com TEA. Para o grupo TEA, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: diagnóstico de TEA de acordo com os critérios do DSM-5, confirmado pelo julgamento do investigador; idade entre 3 e 18 anos; neuroimagem normal (tomografia computadorizada ou ressonância magnética de crânio); e investigação genética normal (cariótipo para meninas; cariótipo e pesquisa de X-frágil para meninos). Foram excluídos os sujeitos com síndromes como Síndrome de X frágil, Síndrome de Rett, Síndrome de Angelman, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Smith-Lemli-Opitz e Esclerose Tuberosa; com presença de cáries dentárias ou doença periodontal; com presença de doença de vias aérea alta ou orofaringe que pudessem prejudicar a coleta.

As coletas ocorreram pela manhã, entre as 8 e 12 horas. A criança era convidada a enxaguar a boca com água, e posteriormente expectorar cerca de 3 ml de saliva diretamente em frasco esterilizado, permanecendo em gelo por no máximo 2h até o momento do processamento.

O protocolo para isolamento do exossoma salivar foi adaptado de Machida e colaboradores (MACHIDA *et al.*, 2015). A amostra foi centrifugada a 2000 g (rcf) durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido, transferido para um tubo de centrifuga estéril, imediatamente acondicionado em reagente QIAzol® (diluição 1:2) e estocado em freezer a -80°C para posterior extração de RNA total.

Extração de RNA e Reação em Cadeia da Polimerase precedida por Transcrição Reversa (RT-qPCR)

O RNA total das amostras de saliva foi isolado usando QIAzol® (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada de acordo com (CHEN *et al.*, 2005). Foi adicionado 1.25 mM de 20 *primers stem-loop* (U6, RNU6, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-199-5p, hsa-miR-218-5p) ao mix contendo RNA, oligo(dT)25V (5 mM), 250 mM de dNTPs (Ludwig, RS, Porto Alegre, Brasil) e água livre de RNase para um volume total de 17 ml seguido de uma incubação a 65°C por 5 minutos e resfriamento em gelo. A enzima MML-V RT (New England Biolabs, MA, USA) foi usada para a síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante. Cada mix de reação foi incubado a 16°C por 30 minutos seguido de outros 30 minutos a 42°C. Todas as amostras de cDNA foram diluídos 50 vezes em água livre de RNase. Os *primers stem-loop*, *primers* de iniciação e o *primer* universal reverso foram desenhados de acordo com protocolo estabelecido (CHEN *et al.*, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real foi realizada no sistema de detecção de PCR em tempo real Bio-Rad CFX384 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O PCR foi realizado no volume de 10 µL contendo 5 µL de cDNA diluído (1:50), 1× SYBR Green I (Invitrogen, CA, USA), 0.1mM de dNTPs, 1× Tampão de PCR, 3mM MgCl₂, 0.25U de Taq DNA Polimerase

(Quatro G, RS, Porto Alegre, Brazil) e 200 nM de cada *primer* de iniciação e reverso. Amostras foram analisadas em triplicatas biológicas em placa de 384 poços, e, um controle foi incluído. Os genes de referência foram escolhidos de acordo com o software GeNorm para determinar o número de miRNA necessários para normalização e para identificar os miRNA mais estáveis para serem usados como normalizadores. As condições de PCR foram setadas como segue: uma etapa inicial de ativação da polimerase por 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 10 segundos a 60 °C para anelamento e 10 segundos a 72 °C para alongamento. A análise da curva de *melting* foi programada ao fim da corrida de PCR no intervalo de 65 a 95 °C, e a temperatura aumentou gradualmente em 0.4 °C. O limite e as linhas de base foram determinados manualmente usando o software do gerenciador Bio-Rad CFX. Para calcular a expressão relativa dos miRNA foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Análise estatística

Foi utilizado o teste t de *Student* para amostras independentes, considerando um valor de p igual ou menor a 0,05 como significativo, através do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 21.0. Os dados são mostrados como média e desvio padrão para as variáveis quantitativas e frequências absolutas e relativas para as variáveis qualitativas.

Resultados

Determinamos a expressão relativa de miRNA na saliva obtida de 26 pacientes com TEA, comparando com controles na mesma faixa etária (7 a 17 anos, média 11,1 anos). O algoritmo GeNorm classificou as proteínas ribossômicas HsRPS18 Fw e HsRPS18 Rv como estáveis e foram usadas como normalizadores para avaliar a expressão relativa do miRNA.

De todos os miRNA, houve amplificação somente do miR-191, com aumento significativo no grupo de pacientes com TEA ($p=0,029$), Figura 1. Os níveis dos 17 miRNA restantes não tiveram seus níveis detectados através da técnica usada no presente estudo.

Discussão

Neste trabalho, identificamos a expressão aumentada do miR-191 em amostras de saliva de pacientes com autismo em relação a normotípicos. Sugerimos, aqui, a avaliação de miRNA isolados a partir de saliva, um fluido biológico de acesso fácil e não invasivo, como uma possível ferramenta biomarcadora com especial ênfase no diagnóstico precoce de TEA. Estudo prévio avaliando a expressão de miRNA em saliva, de um total de 246 detectados e quantificados, evidenciou que 14 miRNA foram diferencialmente expressos em indivíduos com TEA em comparação com controles. Além disso, houve correlações significativas entre desempenho na escala *Vineland Adaptive Behavior Scales* (VABS) e a expressão de miRNA (HICKS *et al.*, 2016).

No atual estudo encontramos um aumento de expressão do miR-191 entre crianças com TEA em relação aos controles, resultado semelhante a trabalhos anteriores que descreveram um aumento de expressão de miR-191 em linfócitos e saliva de pacientes com TEA, inclusive com uma correlação negativa com o score composto da escala VABS (HICKS *et al.*, 2016; SARACHANA *et al.*, 2010). O miR-191 é abundantemente expresso no cérebro (SHAO *et al.*, 2010) e sugere-se que possa contribuir para o desenvolvimento cortical através da regulação negativa do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (KIM *et al.*, 2004; MELLIOS *et al.*, 2008; VARENDI *et al.*, 2014) e apresenta um papel na depressão sináptica de longa duração (HU *et al.*, 2014), um enfraquecimento da transmissão sináptica por diminuição da entrada de cálcio que dura por horas. Se um miRNA fundamental para essa via estiver aumentado, os seus alvos proteicos estarão diminuídos, prejudicando talvez essa depressão, favorecendo a excitação. É sugerido também que o miR-191 possa ter um papel na manutenção da homeostase imune (LYKKEN; LI, 2016), sendo recentemente associado a condições inflamatórias e autoimunes em humanos e camundongos (CASERTA *et al.*, 2016; NAGPAL; KULSHRESHTHA, 2014) inclusive com a hipótese de seu uso como biomarcador no diagnóstico diferencial de doenças inflamatórias intestinais (LIN *et al.*, 2013). Estudos também encontraram um aumento de expressão do miR-191 em pacientes com esclerose múltipla (VISTBAKKA *et al.*, 2017, 2018), lesão cerebral traumática (YANG *et al.*, 2016) e doença de Alzheimer (KUMAR *et al.*, 2013).

Apesar do fácil acesso, a saliva é um dos locais onde há ampla produção de ribonucleases (RNAses) (PERSANO; VECCHIO; POMPA, 2015). A presença de RNase em amostra biológica cujo objetivo é o isolamento de RNA e microRNA representa um sério problema para a contaminação e degradação de amostras em biologia molecular.

Dessa forma, apesar de ser um método promissor de análise de perfil molecular de pacientes, existe ainda uma dificuldade no isolamento de exossomas provenientes de amostra de saliva. Além disso, fatores como tipo de tubo usado para coleta, tempo da coleta ao processamento, velocidade de centrifugação e tempo e ciclos de congelamento e descongelamento também afetam a qualidade e a expressão de miRNA (MITCHELL *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018). Em conjunto, todos esses fatores podem estar relacionados com a identificação de pouco material genético relativo aos 17 microRNA que tiveram baixa expressão neste trabalho.

Diversos miRNA podem ser isolados da saliva usando tanto a reação em cadeia da polimerase quanto kits comerciais disponíveis; A padronização de um protocolo de isolamento pode permitir a antecipação de diagnósticos de diversas doenças que hoje só podem ser diagnósticas por alterações comportamentais. Dessa forma, encorajamos futuros estudos explorando as alterações moleculares no TEA.

Conclusão

Nesse estudo, foi possível isolar e quantificar a expressão do microRNA miR-191 dentre um conjunto de 18 miRNA avaliados em amostras de saliva de pacientes diagnosticados com TEA. Observou-se aumento significativo de sua expressão nesse grupo de pacientes, relacionando vias importantes que possam estar envolvidas na fisiopatologia do TEA. Uma vez que a saliva é um fluido biológico de acesso fácil e não invasivo, encorajamos novas pesquisas para isolamento de microRNA na saliva visando ao uso futuro como biomarcadores e busca por alvos farmacológicos.

Agradecimentos

Ao Fundo de Investimento em Pesquisas e Eventos (FIPE-HCPA), ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Faculdade de Medicina (UFRGS) e ao Grupo de Estudos Translacionais em Transtorno do Espectro Autista (GETTEA- UFRGS).

Referências

- ABU-ELNEEL, K. *et al.* Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. **Neurogenetics**, v. 9, n. 3, p. 153–161, jul. 2008.
- AHMAD, S. F. *et al.* Imbalance between the anti- and pro-inflammatory milieu in blood leukocytes of autistic children. **Molecular Immunology**, v. 82, p. 57–65, 2017.
- ANDERSON, G. M. Autism Biomarkers: Challenges, Pitfalls and Possibilities. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, n. 4, p. 1103–1113, 6 abr. 2015.
- ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5®)**. [s.l.] American Psychiatric Pub, 2013.
- BAIO, J. *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 67, n. 6, p. 1–23, 27 abr. 2018.
- BELZEAUX, R.; LIN, R.; TURECKI, G. Potential Use of MicroRNA for Monitoring Therapeutic Response to Antidepressants. **CNS Drugs**, v. 31, n. 4, p. 253–262, 13 abr. 2017.
- BLANDFORD, S. N.; GALLOWAY, D. A.; MOORE, C. S. The roles of extracellular vesicle microRNAs in the central nervous system. **Glia**, 4 maio 2018.
- CASERTA, S. *et al.* Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28006, 20 set. 2016.
- CHEN, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e179–e179, 27 nov. 2005.
- FULCERI, F. *et al.* Antenatal ultrasound value in risk calculation for Autism Spectrum Disorder: A systematic review to support future research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 92, p. 83–92, 17 set. 2018.
- GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autism and pervasive developmental disorders. **Jornal De Pediatria**, v. 80, n. 2 Suppl, p. S83-94, abr. 2004.
- GEAGHAN, M.; CAIRNS, M. J. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 4, p. 231–239, ago. 2015.
- GOLDANI, A. A. S. *et al.* Biomarkers in autism. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 100, 12 ago. 2014.
- HEUNIS, T.-M.; ALDRICH, C.; DE VRIES, P. J. Recent Advances in Resting-State Electroencephalography Biomarkers for Autism Spectrum Disorder-A Review of Methodological and Clinical Challenges. **Pediatric Neurology**, v. 61, p. 28–37, ago. 2016.
- HICKS, S. D. *et al.* Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. **BMC pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 52, 2016.
- HIRSCH, M. M. *et al.* Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 336–343, maio 2018.
- HOSS, A. G. *et al.* MicroRNAs located in the Hox gene clusters are implicated in huntington's disease pathogenesis. **PLoS genetics**, v. 10, n. 2, p. e1004188, fev. 2014.
- HU, Z. *et al.* miR-191 and miR-135 are required for long-lasting spine remodelling associated with synaptic long-term depression. **Nature communications**, v. 5, p. 3263, 2014.

- HUANG, F. *et al.* Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129052, 10 jun. 2015.
- INGA JÁCOME, M. C. *et al.* Peripheral Inflammatory Markers Contributing to Comorbidities in Autism. **Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 4, 2016.
- KICHUKOVA, T. M. *et al.* Profiling of Circulating Serum MicroRNAs in Children with Autism Spectrum Disorder using Stem-loop qRT-PCR Assay. **Folia medica**, v. 59, n. 1, p. 43–52, 1 mar. 2017.
- KIM, J. *et al.* Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 1, p. 360–365, 6 jan. 2004.
- KUMAR, P. *et al.* Circulating miRNA Biomarkers for Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69807, 29 jul. 2013.
- LI, D.; KARNATH, H.-O.; XU, X. Candidate Biomarkers in Children with Autism Spectrum Disorder: A Review of MRI Studies. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 219–237, 2017.
- LIN, J. *et al.* MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease. **Modern Pathology**, v. 26, n. 1, p. 148–154, 17 jan. 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.
- LYKKEN, E. A.; LI, Q.-J. The MicroRNA miR-191 Supports T Cell Survival Following Common γ Chain Signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 45, p. 23532–23544, 4 nov. 2016.
- MACHIDA, T. *et al.* MicroRNAs in Salivary Exosome as Potential Biomarkers of Aging. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 21294–309, 7 set. 2015.
- MASI, A. *et al.* The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 194–204, 2017.
- MELLIOS, N. *et al.* A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 19, p. 3030–3042, 1 out. 2008.
- MITCHELL, A. J. *et al.* Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32651, 13 dez. 2016.
- MOR, M. *et al.* Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. **Molecular Autism**, v. 6, p. 46, 2015.
- MUNDALIL VASU, M. *et al.* Serum microRNA profiles in children with autism. **Molecular Autism**, v. 5, p. 40, 2014.
- NAGPAL, N.; KULSHRESHTHA, R. miR-191: an emerging player in disease biology. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 99, 2014.
- PERSANO, S.; VECCHIO, G.; POMPA, P. P. A hybrid chimeric system for versatile and ultra-sensitive RNase detection. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9558, 1 ago. 2015.
- QIU, L.; TAN, E. K.; ZENG, L. microRNAs and Neurodegenerative Diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 888, p. 85–105, 2015.
- RUGGERI, B. *et al.* Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 6, p. 1201–1216, 2014.

SARACHANA, T. *et al.* Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. **Genome Medicine**, v. 2, n. 4, p. 23, 2010.

SHAO, N.-Y. *et al.* Comprehensive survey of human brain microRNA by deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 409, 30 jun. 2010.

SHARMA, S. R.; GONDA, X.; TARAZI, F. I. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, 12 maio 2018.

STOICEA, N. *et al.* The MiRNA Journey from Theory to Practice as a CNS Biomarker. **Frontiers in Genetics**, v. 7, p. 11, 9 fev. 2016.

SUN, P. *et al.* MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 38, n. 7, p. 1125-1148, 1 jan. 2018.

TALEBIZADEH, Z.; BUTLER, M. G.; THEODORO, M. F. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 1, n. 4, p. 240–250, ago. 2008.

VARENDI, K. *et al.* miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 71, n. 22, p. 4443–56, 8 nov. 2014.

VISTBAKKA, J. *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers in progressive multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 23, n. 3, p. 403–412, 11 mar. 2017.

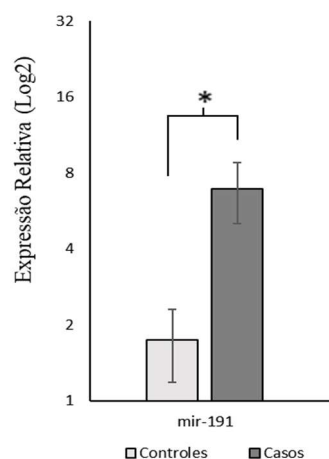
VISTBAKKA, J. *et al.* Evaluation of serum miR-191-5p, miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-376c-3 in multiple sclerosis patients. **Acta Neurologica Scandinavica**, 12 mar. 2018.

YANG, T. *et al.* Elevated serum miR-93, miR-191, and miR-499 are noninvasive biomarkers for the presence and progression of traumatic brain injury. **Journal of neurochemistry**, v. 137, n. 1, p. 122–9, abr. 2016.

YIN, J. *et al.* miR-137: a new player in schizophrenia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 3262–3271, 2014.

ZWAIGENBAUM, L.; PENNER, M. Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. k1674, 21 maio 2018.

Figura 1. Expressão relativa de miRNA em crianças com TEA e controles. As barras representam o Erro Padrão da Média. *P<0,05.



14 ARTIGO 3 - ANALYSIS OF microRNA EXPRESSION LEVELS IN PEDIATRIC PATIENTS DIAGNOSED WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER.

Analysis of microRNA expression levels in pediatric patients diagnosed with autism spectrum disorder.

Josemar Marchezan^{1,2,3,4}, Iohanna Deckmann^{2,3,4,5}, Guilherme Cordenonsi da Fonseca^{2,3,4,5}, Giovanna Carello-Collar^{2,3,4}, Mauro M. Hirsch^{2,3,4,6}, Rogerio Margis^{2,5}, Carmem Gottfried^{2,3,4,6}, Rudimar Riesgo^{1,2,4,7}.

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e Adolescente, Escola de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Grupo de Pesquisa Translacional do Transtorno do Espectro Autista-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação-INCT-NIM.

⁵Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁶Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

⁷Departamento de Pediatria, Unidade de Neurologia Infantil, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

ABSTRACT

Autism spectrum disorder is a neurodevelopmental disorder characterized by difficulty with communication and social interactions, and restrictive and repetitive behaviors, interests and activities. Currently, diagnosis is made exclusively by evaluating behavioral components, since there has yet to be a biological marker deemed suitable for this disease. Several biomarkers have been suggested as potential tools for aiding in the diagnosis of ASD and for evaluating disease progression. microRNAs, which are stable and more resistant to degradation, have shown promise as biomarker candidates. In the present study, a group of 18 microRNAs were evaluated in the saliva of pediatric patients diagnosed with ASD and in control pediatric patients. miR-191 isolated from saliva samples was overexpressed in patients diagnosed with ASD. miR-191 is involved in immune processes, cortical development and long-lasting remodeling of the spine

associated with long-term synaptic depression. Therefore, it is possible that miR-191 may be involved in the imbalance found in these pathways in ASD patients. Given that saliva is easily obtainable, we encourage more studies that explore microRNA isolation from this biological fluid as potential biomarkers, as well as for discovering new therapeutic targets.

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by difficulty with communication and social interactions, and restrictive and repetitive behaviors, interests and activities (ASSOCIATION, 2013). Between 2000 and 2014, there an 150% increase in its prevalence, and currently the *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimates a prevalence of 16,8 for every 1000 children (BAIO *et al.*, 2018). In spite of the research advances regarding ASD, its diagnosis remains a clinical one (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; GOLDANI *et al.*, 2014; SHARMA; GONDA; TARAZI, 2018). Several biomarkers have been proposed for aiding in the diagnosis of ASD, including biochemical, morphological, immunological, hormonal neurophysiological, neuroanatomic and neuropsychological biomarkers (AHMAD *et al.*, 2017; FULCERI *et al.*, 2018; HEUNIS; ALDRICH; DE VRIES, 2016; INGA JÁCOME *et al.*, 2016; LI; KARNATH; XU, 2017; MASI *et al.*, 2017; RUGGERI *et al.*, 2014), for these could aid in the early diagnosis of ASD, in measuring the risk of developing ASD, in determining the prognosis of ASD, and in the characterization of specific subgroups that may or may not respond well to certain treatment modalities (ANDERSON, 2015; GOLDANI *et al.*, 2014; ZWAIGENBAUM; PENNER, 2018).

MicroRNAs stand out among the proposed biomarkers for ASD. These are a group of non-coding RNAs, of approximately 22 nucleotides long, and which have been implied in several neuropsychiatric conditions (BELZEAUX; LIN; TURECKI, 2017; GEAGHAN; CAIRNS, 2015; HOSS *et al.*, 2014; QIU; TAN; ZENG, 2015; YIN *et al.*, 2014). With regards to ASD, human studies have shown a difference in miRNA expression levels in comparison to healthy controls in the cerebellar cortex (ABU-ELNEEL *et al.*, 2008), brain (MOR *et al.*, 2015), lymphocytes (SARACHANA *et al.*, 2010; TALEBIZADEH; BUTLER; THEODORO, 2008), blood serum (KICHUKOVA *et al.*, 2017; MUNDALIL VASU *et al.*, 2014), whole blood (HIRSCH *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2015), and saliva (HICKS *et al.*, 2016).

The use of miRNA profiles as biomarkers have received attention over the last few years (BLANDFORD; GALLOWAY; MOORE, 2018), for they are more stable in comparison to messenger RNA (mRNA) (KICHUKOVA *et al.*, 2017), are stably present in most biological fluids, are involved in the pathogenesis of many diseases, and may be detected in the initial stages of most pathological conditions (STOICEA *et al.*, 2016). In the present study, a set of miRNAs present in the saliva of pediatric patients diagnosed with ASD was compared to those present in a pediatric control population.

Methods

Subjects

Individuals were recruited for this study at the ASD outpatient clinic at the Neuropediatric Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Individuals were recruited as controls at the Pediatric or Pediatric Surgery outpatient clinic in the same hospital. Parents and/or guardians authorized their participation in the study and signed an Informed Consent form. This study received approval of the Research Ethics Committee (CEP-HCPA) and is registered under number 16-0567.

For the control group, individuals who displayed behavior compatible with their chronological age and who were not diagnosed with any conditions that might affect behavior were age-matched to the ASD cases. Inclusion criteria for pediatric patients diagnosed with ASD were as follows: clinical diagnosis of ASD, according to the 5th edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), as per the principal investigator's judgement; age between 3 and 18 years old; normal neuroimaging exams (computerized tomography or nuclear magnetic resonance); and normal genetic parameters (karyotype for girls; karyotype and Fragile X results for boys). Subjects with Fragile X syndrome, Rett syndrome, Angelman syndrome, Prader-Willi syndrome, Smith-Lemli-Opitz syndrome, and tuberous sclerosis were excluded from the study, as well as subjects with dental caries, periodontal disease, or with any condition of the upper respiratory tract or oropharynx that may interfere with the saliva sample collection.

Sample collection took place in the morning, from 8:00 AM until 12:00 PM. The subject was invited to rinse his/her mouth with water to expectorate approximately 3 mL

of saliva directly into a sterilized cup soon after. The cup was kept under refrigeration for up to two hours until sample processing.

The protocol for isolation of the salivary exosome was adapted from Machida and colleagues (MACHIDA *et al.*, 2015). The sample was centrifuged at 2000 g (rcf) for 10 minutes at 4°C. The supernatant was then transferred to a sterile centrifuge tube, to which QIAzol® reagent was added 1:2 and stored at -80°C until total RNA extraction.

RNA Extraction, Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA from saliva samples was isolated using QIAzol® (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.

cDNA synthesis was undertaken according to Chen and collaborators (CHEN *et al.*, 2005). Briefly, 1.25 mM stem-loop primers for each miRNA (U6, RNU6, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-199-5p, hsa-miR-218-5p) were added to a mix containing RNA, oligo(dT)25V (5 mM), 250 mM dNTPs (Ludwig, RS, Porto Alegre, Brazil) and RNase-free water in a final volume of 17 µL. This was submitted to an incubation step at 65°C for 5 minutes, and then placed on ice. The MML-V RT enzyme (New England Biolabs, MA, USA) was used for cDNA synthesis according to the manufacturer's instructions. Each reaction mix was incubated at 16°C for 30 minutes followed by another 30 minutes at 42°C. All cDNA samples were diluted 50 X in RNase-free water. Stem loop primers, initiation primers and the universal reverse primer were designed according to Chen and collaborators (CHEN *et al.*, 2005).

Real-time PCR was performed in a Bio-Rad CFX384 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizing SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR reaction took place in a total volume of 10 µL containing 5 µL of diluted cDNA (1:50), 1 X SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.1 mM dNTPs, 1 X Buffer, 3 mM MgCl₂, 0.25 U Taq DNA polymerase (Quatro G, Porto Alegre, RS, Brazil) and 200 nM of each forward and reverse primer. Samples were analyzed in triplicates in a 384-well plate, in which a

control was also included. Reference genes were chosen according to the GeNorm software, in order to determine the necessary miRNAs for normalization and to identify the most stable miRNAs to be used as normalizers. In order to determine miRNA amplification, PCR was set up as follows: an initial 5-minute step at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C for denaturation, 10 seconds at 60°C for annealing and 10 seconds at 72°C for elongation. Melting curve analysis was programmed at the end of the PCR reaction at the 65°C and 95°C interval, with readings at every 0.4°C increase in temperature. Baselines and limits were determined manually using the Bio-Rad CFX software. To calculate relative miRNA expression, the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was employed (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Statistical analysis

Data is shown as mean \pm standard deviation for quantitative variable and as absolute and relative frequencies for qualitative variables. The Student's t test was employed for independent samples, where $P \leq 0.05$ was considered significant. Results were analyzed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) program, v. 21.0.

Results

The relative miRNA expression in the saliva of 26 patients compared to their respective case-matched controls (7-17 years old, mean 11.1 years) was determined. The GeNorm algorithm classified ribosomal proteins HsRPS18 Fw and HsRPS18 Rv as stable, and these were used as normalizers in order to evaluate relative miRNA expression.

Of all miRNA tested, only mir-191 amplified, and was significantly more expressed in the saliva of patients diagnosed with ASD, as compared to their case-matched controls ($P = 0.029$, Figure 1). The remaining 17 miRNAs were not detected by the methods employed in this study.

Discussion

In this study, we identified an increased expression. of miR-191 in saliva samples obtained from pediatric patients diagnosed with ASD, in comparison to age-matched

controls. We opted for miRNA analysis in saliva because these samples are easily obtainable via non-invasive methods, and because miRNA may be employed as a biomarker for the early diagnosis of ASD. A previous study evaluating miRNA expression in saliva showed that 14 different miRNAs, out of 246 that were detected and quantified, were differentially expressed in patients diagnosed with ASD in comparison to healthy controls. Moreover, these expression profiles demonstrated significant correlations with the Vineland Adaptive Behavior Scales (VABS) (HICKS *et al.*, 2016).

Here, we found that expression of miR-191 is increased in patients diagnosed with ASD in comparison to controls, a finding which corroborates other studies which reported an increase in miR-191 in lymphocytes and saliva of patients diagnosed with ASD, correlating negatively with the VABS composite score (HICKS *et al.*, 2016; SARACHANA *et al.*, 2010). MiR-191 is widely expressed in the brain, (SHAO *et al.*, 2010), and it is suggested that it may contribute to cortical development via the negative regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (KIM *et al.*, 2004; MELLIOS *et al.*, 2008; VARENDI *et al.*, 2014). It also plays a role in long-term synaptic depression (HU *et al.*, 2014), which is a weakening in synaptic transmission as a result of calcium depletion that lasts hours. If a miRNA which is crucial for this pathway is overexpressed, its protein targets will consequently decrease in concentration, harming synaptic depression and favoring excitation. It is suggested that miR-191 might also play a role in immune homeostasis (LYKKEN; LI, 2016), as it was recently associated with inflammatory and immune conditions in mice (CASERTA *et al.*, 2016; NAGPAL; KULSHRESHTHA, 2014). Other groups have also suggested its use as a biomarker for the differential diagnosis of inflammatory intestinal disease (LIN *et al.*, 2013). Studies have also found an increase in miR-191 expression in patients diagnosed with multiple sclerosis (VISTBAKKA *et al.*, 2017, 2018), traumatic brain injury (YANG *et al.*, 2016), and Alzheimer's disease (KUMAR *et al.*, 2013).

Although saliva is easily obtainable, it is also rich in ribonucleases (RNAses) (PERSANO; VECCHIO; POMPA, 2015). The presence of RNase in a biological sample obtained for RNA and microRNA isolation poses a serious problem, increasing the chances of sample contamination and degradation. Therefore, even though miRNA analysis is a promising tool for analyzing the molecular blueprints of each patient, the challenge of isolating exosomes from saliva samples remains. Moreover, other factors such as the type of tube used during sample collection, sample processing time, centrifugation speed and

freeze-thaw cycles all affect the quality and chances of detecting miRNAs (MITCHELL *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018). Taken together, these factors may explain why only one miRNA out of 18 was identified in our patient cohort.

Several miRNA may be isolated from saliva via PCR and/or commercially available kits. Establishing a miRNA isolation protocol for subsequent miRNA analysis may contribute to the early diagnosis of diseases that, nowadays, can only be diagnosed via observation of behavioral changes. We therefore encourage further studies that explore specific molecular alterations in patients diagnosed with ASD.

Conclusion

In the present study, out of a total of 18 microRNAs, microRNA miR-191 was isolated and quantified from saliva samples of pediatric patients diagnosed with ASD. A significant increase in miR-191 expression was observed in these patients, suggesting that important pathways regulated by miR-191 might be involved in the pathogenesis of ASD. Since saliva is an easily obtainable biological fluid via non-invasive methods, we encourage further research exploring microRNA isolation protocols in saliva, with hopes of discovering new disease biomarkers and therapeutic targets.

Acknowledgements

We would like to thank the HCPA Research and Events Investment Fund (Fundo de Investimento em Pesquisas e Eventos; FIPE-HCPA), the Graduate Program in Child and Adolescent Health of the UFRGS Medical School (Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Faculdade de Medicina - UFRGS), and the Autism Spectrum Disorder Translational Research Group (Grupo de Pesquisas Translacionais em Transtorno do Espectro Autista - GETTEA- UFRGS).

References

ABU-ELNEEL, K. *et al.* Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics*, v. 9, n. 3, p. 153–161, jul. 2008.

- AHMAD, S. F. *et al.* Imbalance between the anti- and pro-inflammatory milieu in blood leukocytes of autistic children. **Molecular Immunology**, v. 82, p. 57–65, 2017.
- ANDERSON, G. M. Autism Biomarkers: Challenges, Pitfalls and Possibilities. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, n. 4, p. 1103–1113, 6 abr. 2015.
- ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5®)**. [s.l.] American Psychiatric Pub, 2013.
- BAIO, J. *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 67, n. 6, p. 1–23, 27 abr. 2018.
- BELZEAUX, R.; LIN, R.; TURECKI, G. Potential Use of MicroRNA for Monitoring Therapeutic Response to Antidepressants. **CNS Drugs**, v. 31, n. 4, p. 253–262, 13 abr. 2017.
- BLANDFORD, S. N.; GALLOWAY, D. A.; MOORE, C. S. The roles of extracellular vesicle microRNAs in the central nervous system. **Glia**, 4 maio 2018.
- CASERTA, S. *et al.* Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28006, 20 set. 2016.
- CHEN, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e179–e179, 27 nov. 2005.
- FULCERI, F. *et al.* Antenatal ultrasound value in risk calculation for Autism Spectrum Disorder: A systematic review to support future research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 92, p. 83–92, 17 set. 2018.
- GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autism and pervasive developmental disorders. **Jornal De Pediatria**, v. 80, n. 2 Suppl, p. S83-94, abr. 2004.
- GEAGHAN, M.; CAIRNS, M. J. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry. **Biological Psychiatry**, v. 78, n. 4, p. 231–239, ago. 2015.
- GOLDANI, A. A. S. *et al.* Biomarkers in autism. **Frontiers in psychiatry**, v. 5, p. 100, 12 ago. 2014.
- HEUNIS, T.-M.; ALDRICH, C.; DE VRIES, P. J. Recent Advances in Resting-State Electroencephalography Biomarkers for Autism Spectrum Disorder-A Review of Methodological and Clinical Challenges. **Pediatric Neurology**, v. 61, p. 28–37, ago. 2016.
- HICKS, S. D. *et al.* Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. **BMC pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 52, 2016.
- HIRSCH, M. M. *et al.* Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 336–343, maio 2018.
- HOSS, A. G. *et al.* MicroRNAs located in the Hox gene clusters are implicated in huntington's disease pathogenesis. **PLoS genetics**, v. 10, n. 2, p. e1004188, fev. 2014.
- HU, Z. *et al.* miR-191 and miR-135 are required for long-lasting spine remodelling associated with synaptic long-term depression. **Nature communications**, v. 5, p. 3263, 2014.
- HUANG, F. *et al.* Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129052, 10 jun. 2015.
- INGA JÁCOME, M. C. *et al.* Peripheral Inflammatory Markers Contributing to Comorbidities in

- Autism. **Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 4, 2016.
- KICHUKOVA, T. M. *et al.* Profiling of Circulating Serum MicroRNAs in Children with Autism Spectrum Disorder using Stem-loop qRT-PCR Assay. **Folia medica**, v. 59, n. 1, p. 43–52, 1 mar. 2017.
- KIM, J. *et al.* Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 1, p. 360–365, 6 jan. 2004.
- KUMAR, P. *et al.* Circulating miRNA Biomarkers for Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69807, 29 jul. 2013.
- LI, D.; KARNATH, H.-O.; XU, X. Candidate Biomarkers in Children with Autism Spectrum Disorder: A Review of MRI Studies. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 219–237, 2017.
- LIN, J. *et al.* MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease. **Modern Pathology**, v. 26, n. 1, p. 148–154, 17 jan. 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.
- LYKKEN, E. A.; LI, Q.-J. The MicroRNA miR-191 Supports T Cell Survival Following Common γ Chain Signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 45, p. 23532–23544, 4 nov. 2016.
- MACHIDA, T. *et al.* MicroRNAs in Salivary Exosome as Potential Biomarkers of Aging. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 21294–309, 7 set. 2015.
- MASI, A. *et al.* The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 194–204, 2017.
- MELLIOS, N. *et al.* A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 19, p. 3030–3042, 1 out. 2008.
- MITCHELL, A. J. *et al.* Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32651, 13 dez. 2016.
- MOR, M. *et al.* Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. **Molecular Autism**, v. 6, p. 46, 2015.
- MUNDALIL VASU, M. *et al.* Serum microRNA profiles in children with autism. **Molecular Autism**, v. 5, p. 40, 2014.
- NAGPAL, N.; KULSHRESHTHA, R. miR-191: an emerging player in disease biology. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 99, 2014.
- PERSANO, S.; VECCHIO, G.; POMPA, P. P. A hybrid chimeric system for versatile and ultra-sensitive RNase detection. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 9558, 1 ago. 2015.
- QIU, L.; TAN, E. K.; ZENG, L. microRNAs and Neurodegenerative Diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 888, p. 85–105, 2015.
- RUGGERI, B. *et al.* Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 6, p. 1201–1216, 2014.
- SARACHANA, T. *et al.* Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. **Genome Medicine**, v. 2, n. 4, p. 23, 2010.

SHAO, N.-Y. *et al.* Comprehensive survey of human brain microRNA by deep sequencing. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 409, 30 jun. 2010.

SHARMA, S. R.; GONDA, X.; TARAZI, F. I. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, 12 maio 2018.

STOICEA, N. *et al.* The MiRNA Journey from Theory to Practice as a CNS Biomarker. **Frontiers in Genetics**, v. 7, p. 11, 9 fev. 2016.

SUN, P. *et al.* MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 38, n. 7, p. 1125-1148, 1 jan. 2018.

TALEBIZADEH, Z.; BUTLER, M. G.; THEODORO, M. F. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 1, n. 4, p. 240–250, ago. 2008.

VARENDI, K. *et al.* miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 71, n. 22, p. 4443–56, 8 nov. 2014.

VISTBAKKA, J. *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers in progressive multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 23, n. 3, p. 403–412, 11 mar. 2017.

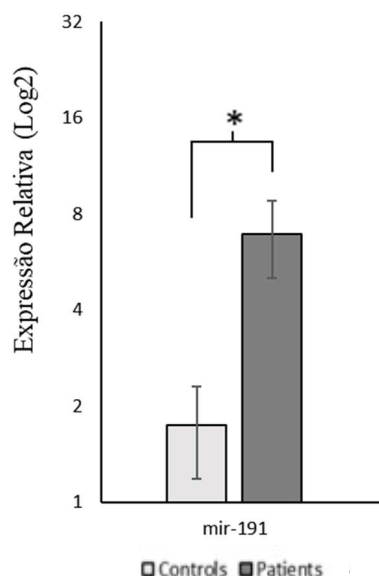
VISTBAKKA, J. *et al.* Evaluation of serum miR-191-5p, miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-376c-3 in multiple sclerosis patients. **Acta Neurologica Scandinavica**, 12 mar. 2018.

YANG, T. *et al.* Elevated serum miR-93, miR-191, and miR-499 are noninvasive biomarkers for the presence and progression of traumatic brain injury. **Journal of neurochemistry**, v. 137, n. 1, p. 122–9, abr. 2016.

YIN, J. *et al.* miR-137: a new player in schizophrenia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 3262–3271, 2014.

ZWAIGENBAUM, L.; PENNER, M. Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. k1674, 21 maio 2018.

Figure 1. Relative expression of mir-191 in children diagnosed with ASD, in comparison to age-matched controls. Bars represent mean \pm standard error. *P<0.05.



15 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O prejuízo individual causado pelo TEA afeta várias faces do funcionamento diário e, muitas vezes, impede a independência na vida adulta. O substancial efeito econômico direto e indireto dos tratamentos e o sofrimento do indivíduo e de sua família reforçam a necessidade da busca contínua por intervenções efetivas. A prevalência do TEA aumentou dramaticamente nas últimas décadas e apesar dos avanços do conhecimento sobre o transtorno, aspectos de sua etiologia permanecem não esclarecidos. Evidências acumuladas até o momento sugerem que fatores genéticos, ambientais, inflamatórios, imunológicos e metabólicos desempenham um papel proeminente no distúrbio. Até o momento não existe um marcador biológico para o TEA ou terapia que reverta completamente seus sintomas.

Os miRNA surgem como possíveis biomarcadores para doenças do sistema nervoso central, incluindo o TEA. Eles podem auxiliar no diagnóstico precoce, no prognóstico, na caracterização de subgrupos de pacientes e na definição de subconjuntos de indivíduos que responderiam mais favoravelmente a tratamentos específicos. A busca por biomarcadores salivares para doenças neuropsiquiátricas tem aumentado nos últimos anos, uma vez que a saliva é um fluido biológico de acesso fácil e não invasivo, minimizando muitas limitações associadas às outras técnicas.

Existe a possibilidade de que a disfunção imune no TEA possa ser caminho viável para a intervenção farmacológica, e um subgrupo de indivíduos com TEA poderia se beneficiar de terapias de base imunológica. O resveratrol apresenta capacidade de modulação da resposta inflamatória e atividade neuroprotetora. Em modelos animais de autismo o resveratrol melhora os sintomas comportamentais típicos do TEA.

No estudo piloto, pela primeira vez administraram-se resveratrol a crianças ou a indivíduos com autismo. Assim, trata-se de um estudo com número pequeno de participantes, mas com relevância clínica, pois sugeriu que o resveratrol possa melhorar os sintomas do TEA em alguns pacientes, além de ter sido seguro e bem tolerado nessa faixa etária. Além disso, houve mudança na expressão de três de marcadores moleculares relacionados à processos inflamatórios, miR-124-3p, miR-125a-5p e miR-195-5p, o que reforça a necessidade da investigação desses microRNA tanto como biomarcadores no TEA como de sua ação na etiopatogenia da doença.

Também verificamos, apesar das dificuldades metodológicas de manipulação de amostra de saliva, um aumento expressão do miR-191 em crianças com TEA em relação

à controles. O miR-191 está relacionando vias importantes que podem estar envolvidas na fisiopatologia do TEA.

Apesar das limitações do estudo atual, seus resultados são promissores. Estudos maiores, randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo com a administração de resveratrol em crianças e adolescentes com autismo serão necessários para melhor avaliar a sua eficácia. Além disso, novas pesquisas utilizando microRNA, tanto na tentativa de compreender seu papel na etiopatogenia do TEA, quanto sua utilidade como biomarcador, são incentivadas.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – VOLUNTÁRIOS PARA USO DE RESVERATROL.

Título do Projeto: USO DE RESVERATROL EM SUJEITOS DE PESQUISA PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.

A criança ou adolescente pelo qual você é responsável está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o efeito de Resveratrol nos sintomas do autismo, isto é, se o resveratrol melhora os sintomas do autismo. Esta pesquisa está sendo realizada pela Unidade de Neurologia Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: a criança ou adolescente irá tomar Resveratrol (uma substância encontrada na casca da uva) na dose de 200mg por via oral (pela boca), uma vez ao dia, de forma contínua pelo período de 90 dias (3 meses). Para verificar se o resveratrol está tendo efeito, você terá que responder um questionário sobre o comportamento da criança ou adolescente que você é responsável antes do início do tratamento, com 45 dias de tratamento e com 90 dias de tratamento. Essas perguntas serão realizadas em consultas no Centro de Pesquisas Clínicas do HCPA, com cerca de 1 hora de duração. Nessas consultas a criança ou adolescente também será examinado e os sinais vitais (temperatura, pressão arterial, pulso e respiração) serão avaliados. Também para melhor avaliar os efeitos do resveratrol serão coletados exames de sangue, uma amostra antes do início do tratamento, e após 45 e 90 dias do uso do resveratrol (cerca de 5ml de sangue em cada coleta).

O material biológico coletado (sangue) será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconseguir com o uso do material. Neste caso você,

- () Autoriza que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.
- () Não autoriza que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são efeitos colaterais do resveratrol. Nas pesquisas anteriores com o resveratrol em pacientes adultos, os efeitos colaterais mais comuns foram: náuseas, vômitos, diarreia e alergia na pele. Além disso, na coleta de sangue, pode haver desconforto da picada da agulha e poderão ocorrer complicações locais como dor e hematoma (roxo).

O possível benefício decorrente da participação na pesquisa é a possível redução (melhora) dos sintomas do autismo, como melhora da interação social e diminuição das estereotípias e do apego a rotinas. É importante que você entenda que não existe garantia de que este tratamento funcionará para melhorar os sintomas do seu a criança ou adolescente pelo qual você é responsável. Mesmo que haja benefícios na criança ou

adolescente pelo qual você é responsável com o uso da substância, por se tratar de um estudo inicial, ela não será fornecida para utilização após o término da pesquisa.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá haver ressarcimento por despesas decorrentes da participação, como transporte até o hospital, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Rudimar dos Santos Riesgo, pelo telefone 51 999875545, com o pesquisador Josemar Marchezan, pelo telefone 51 999073034 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (*se aplicável*)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNA – CASOS.

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNA EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar alterações genéticas no autismo através da dosagem de alguns microRNA (pequenas partículas simples de material genético) na saliva e verificar se essas alterações genéticas têm relação com o comportamento desses pacientes. Esta pesquisa está sendo realizada pela Unidade de Neurologia Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: a criança realizará a coleta de uma amostra de saliva, no total de 3ml (meia colher de sopa) e o (a) senhor(a) responderá a 4 questionários sobre o comportamento do paciente. Para facilitar a coleta, a produção de saliva poderá ser estimulada com ácido cítrico (ácido encontrado naturalmente em algumas frutas como o limão), o que poderá gerar algum desconforto.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são devidos a coleta de saliva. Não é necessário “picar” a criança e existem poucas complicações, como por exemplo náuseas (ânsia de vômito). Para limitar ao máximo possível estes riscos, a criança estará sob supervisão rigorosa no momento desta coleta.

O possível benefício decorrente da participação na pesquisa é o aumento do conhecimento sobre o autismo, que poderá beneficiar futuros pacientes. A pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá haver ressarcimento por despesas decorrentes da participação, por exemplo transporte, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação

do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconsentir com o uso do material. Neste caso você,

() Autoriza que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

() Não autoriza que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras."

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Rudimar dos Santos Riesgo pelo telefone 51 33598486, com o pesquisador Dr. Josemar Marchezan, pelo telefone 51 33598486 / 51 999073034 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (se aplicável)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNA - CONTROLES

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNA EM SUJEITOS PEDIÁTRICOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar alterações genéticas no autismo através da dosagem de alguns microRNA (pequenas partículas simples de material genético) na saliva e verificar se essas alterações genéticas têm relação com o comportamento desses pacientes. Esta pesquisa está sendo realizada pela Unidade de Neurologia Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Os dados dos pacientes com autismo serão comparados com o de pessoas de mesma idade e sexo sem a doença. Isto significa que estamos convidando a criança a qual você é responsável para participar do projeto porque ela não tem a doença. Esses são o que chamamos de controles do estudo.

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: a criança realizará a coleta de uma amostra de saliva, no total de 3ml (meia colher de sopa). Para facilitar a coleta, a produção de saliva poderá ser estimulada com ácido cítrico (ácido encontrado naturalmente em algumas frutas como o limão), o que poderá gerar algum desconforto.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são devidos a coleta de saliva. Não é necessário “picar” a criança e existem poucas complicações, como por exemplo náuseas (ânsia de vômito). Para limitar ao máximo possível estes riscos, a criança estará sob supervisão rigorosa no momento desta coleta.

O possível benefício decorrente da participação na pesquisa é o aumento do conhecimento sobre o autismo, que poderá beneficiar futuros pacientes. A pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá haver ressarcimento por despesas decorrentes da participação, por exemplo transporte, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este

material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconseguir com o uso do material. Neste caso você,

() Autoriza que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

() Não autoriza que as amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras."

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Rudimar dos Santos Riesgo pelo telefone 51 33598486, com o pesquisador Dr. Josemar Marchezan, pelo telefone 51 33598486 / 51 999073034 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Assinatura (se aplicável)

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXOS

ANEXO A – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA SEGUNDO O DSM-5.

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

a) déficits persistentes na comunicação social e na interação social em múltiplos contextos, conforme manifestado pelo que segue, atualmente ou por história prévia:

- déficits na reciprocidade socioemocional, variando, por exemplo, de abordagem anormal e dificuldade para estabelecer uma conversa normal a compartilhamento reduzido de interesses, emoções ou afeto, a dificuldade para iniciar ou responder a interações sociais;
- déficits nos comportamentos comunicativos não verbais usados para interação social, variando, por exemplo, de comunicação verbal e não verbal pouco integrada a anormalidades no contato visual e linguagem corporal ou déficits na compreensão e uso de gestos, a ausência total de expressões faciais e comunicação não verbal;
- 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, conforme manifestado por pelo menos dois dos seguintes, atualmente ou por história prévia:

- movimentos motores, uso de objetos ou fala estereotipados ou repetitivos;
- insistência nas mesmas coisas, adesão inflexível a rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal ou não verbal;
- interesses fixos e altamente restritos que são anormais em intensidade ou foco,
- hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum por aspectos sensoriais do ambiente;

c) os sintomas devem estar presentes precocemente no período do desenvolvimento (mas podem não se tornar plenamente manifestos até as demandas sociais excedam as capacidades limitadas ou podem ser mascarados por estratégias aprendidas mais tarde na vida);

d) os sintomas causam prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo no presente;

e) essas perturbações não são mais bem explicadas por deficiência intelectual ou por atraso global do desenvolvimento. Deficiência intelectual e TEA costumam ser comórbidos; para fazer o diagnóstico da comorbidade de TEA e deficiência intelectual, a comunicação social deve estar abaixo do esperado para o nível geral de desenvolvimento.

ANEXO B – ESCALA *CLINICAL GLOBAL IMPRESSION* (CGI)

Clinical Global Impression – Severity Scale

Considerando a sua experiência com esta doença, quão mentalmente doente está o paciente neste momento?

1. Normal, não doente;
2. Limítrofe para a doença mental;
3. Levemente doente;
4. Moderadamente doente;
5. Marcadamente doente;
6. Gravemente doente;
7. Doença mental extremamente grave.

Clinical Global Impression – Improvement Scale

Comparando a condição do paciente no início do tratamento, qual o grau de alteração que ocorreu?

1. Muito melhor;
2. Melhor;
3. Ligeiramente melhor;
4. Sem alteração;
5. Ligeiramente pior;
6. Pior;
7. Muito pior.

ANEXO C - *ABERRANT BEHAVIOR CHECKLIST (ABC)*

Instruções:

A escala de sintomas ABC comunitária foi elaborada para ser usada em pacientes que vivem em comunidade. Por isso o termo paciente é usado para se referir à pessoa que está sendo avaliada, que pode ser uma criança em idade escolar, um adolescente ou um adulto.

Pontue o comportamento do paciente em relação às quatro últimas semanas. Para cada item decida se o comportamento é um problema e circule o número apropriado:

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.

Quando estiver julgando o comportamento do paciente, tenha em mente os pontos a seguir:

a) Considere a frequência com que cada comportamento acontece de forma relativa. Por exemplo, se um paciente tem em média mais acessos de fúria do que a maioria de outros pacientes que você conhece, ou do que a maioria dos seus colegas de classe, a gravidade é provavelmente moderada (2) ou grave (3), mesmo que ocorra somente uma ou duas vezes por semana. Outros comportamentos, como desobediência, provavelmente precisam ocorrer com maior frequência para merecer a pontuação máxima.

b) Considere a opinião de outros cuidadores do paciente, caso você tenha acesso a essa informação. Se o paciente tem problemas com outros, mas não com você, tente levar em conta a situação de maneira geral.

c) Tente considerar se um determinado comportamento interfere no desenvolvimento, funcionamento ou relacionamento dele/dela. Por exemplo, balançar o corpo ou retraimento social podem não perturbar outras crianças ou adultos, mas certamente atrapalha o funcionamento ou desenvolvimento individual.

Não se detenha muito tempo em cada item, sua primeira impressão geralmente é a correta.

1. Excessivamente ativo(a) em casa, na escola, no trabalho ou em qualquer lugar 0 1 2 3.
2. Fere-se de propósito 0 1 2 3.
3. Indiferente, lento(a), parado(a) 0 1 2 3.
4. Agressivo(a) com outras crianças ou adultos (verbalmente ou fisicamente) 0 1 2 3.
5. Procura se isolar dos outros 0 1 2 3
6. Movimentos corporais repetitivos e sem sentido 0 1 2 3
7. Barulhento(a) (ruídos grosseiros e inapropriados) 0 1 2 3
8. Grita inapropriadamente 0 1 2 3
9. Fala excessivamente 0 1 2 3
10. Crises de birra/acesso de fúria 0 1 2 3
11. Comportamentos estereotipados; movimentos anormais, repetitivos 0 1 2 3
12. Preocupado(a), fixa o olhar no vazio 0 1 2 3

13. Impulsivo(a) (age sem pensar) 0 1 2 3
14. Irritável e queixoso(a) 0 1 2 3
15. Inquieto(a), incapaz de permanecer sentado(a) 0 1 2 3
16. Retraído(a); prefere atividades solitárias 0 1 2 3
17. Estranho, comportamento esquisito 0 1 2 3
18. Desobediente; difícil de controlar 0 1 2 3
19. Grita em momentos inapropriados 0 1 2 3
20. Expressão facial imóvel, fixa; falta de resposta emocional 0 1 2 3
21. Incomoda os outros 0 1 2 3
22. Fala repetitiva 0 1 2 3
23. Não faz nada a não ser ficar sentado(a) e olhar os outros 0 1 2 3
24. Não é cooperativo 0 1 2 3
25. Depressivo(a) 0 1 2 3
26. Resiste a qualquer forma de contato físico 0 1 2 3
27. Movimenta ou balança a cabeça de trás para frente repetidamente 0 1 2 3
28. Não presta atenção às instruções 0 1 2 3
29. Os pedidos têm que ser atendidos imediatamente 0 1 2 3
30. Isola-se de outras crianças ou de adultos 0 1 2 3
31. Tumultua as atividades em grupo 0 1 2 3
32. Fica sentado(a) ou em pé na mesma posição por muito tempo 0 1 2 3
33. Fala sozinho(a) em voz alta 0 1 2 3
34. Chora por mínimos aborrecimentos e machucados 0 1 2 3
35. Movimentos repetitivos das mãos, do corpo ou da cabeça 0 1 2 3
36. O humor muda rapidamente 0 1 2 3
37. Não acompanha as atividades estruturadas (não reage) 0 1 2 3
38. Não permanece sentado (ex. durante as lições ou outras atividades, refeições etc.)
0 1 2 3
39. Não fica sentado(a) nem por um tempo mínimo 0 1 2 3
40. Difícil alcançá-lo(la), contatá-lo(la) ou chegar até ele(ela) 0 1 2 3
41. Chora e grita inapropriadamente 0 1 2 3
42. Prefere ficar sozinho(a) 0 1 2 3
43. Não tenta se comunicar por palavras ou gestos 0 1 2 3
44. Distrai-se com facilidade 0 1 2 3
45. Balança ou agita as mãos ou pés repetidamente 0 1 2 3
46. Repete várias vezes uma palavra ou frase 0 1 2 3
47. Bate os pés, ou faz barulho estrondoso com objetos ou bate portas com força 0 1 2
3
48. Constantemente corre ou pula em torno do cômodo 0 1 2 3
49. Balança o corpo para trás e para frente repetidamente 0 1 2 3
50. Causa machucados em si mesmo 0 1 2 3
51. Não presta atenção quando falam com ele(ela) 0 1 2 3
52. Pratica violência contra si próprio 0 1 2 3
53. Inativo(a), nunca se move espontaneamente 0 1 2 3
54. Tende a ser excessivamente ativo(a) 0 1 2 3
55. Reage negativamente ao contato afetivo 0 1 2 3
56. Ignora propositalmente as instruções 0 1 2 3
57. Tem acesso de fúria ou birra quando contrariado 0 1 2 3
58. Demonstra pouca reação social aos outros 0 1 2 3