

CINTIA CRISTINA FADINI

**CORRELAÇÃO ENTRE 6-SULFATOXIMELATONINA, DISTÚRBIOS DO SONO
E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM TRANSTORNO DO ESPECTRO DO
AUTISMO (TEA)**

MARÍLIA

2013

CINTIA CRISTINA FADINI

**CORRELAÇÃO ENTRE 6-SULFATOXIMELATONINA, DISTÚRBIOS DO SONO
E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM TRANSTORNO DO ESPECTRO DO
AUTISMO (TEA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências, da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Marília (SP) para obtenção do título de Mestre em Fonoaudiologia.
Área de Concentração: Distúrbios da Comunicação Humana.

Orientadora: Dra. Luciana Pinato

MARÍLIA

2013

Fadini, Cintia Cristina.

F145c Correlação entre 6-sulfatoximelatonina, distúrbios do sono e citocinas inflamatórias em Transtornos do espectro do autismo (TEA) / Cintia Cristina Fadini. – Marília, 2013. 91 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Fonoaudiologia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Filosofia e Ciências, 2013.

Bibliografia: f. 78-88.

Orientadora: Luciana Pinato.

1. Autismo. 2. Melatonina. 3. Distúrbios do sono. 4. Comportamento humano. 5. Citocinas. 6. Transtornos do espectro do autismo. 7. Sistema nervoso central – Inflamação.
I. Título.

CDD 616.8982

FADINI, C. C. Correlação entre 6-sulfatoximetatonina, distúrbios do sono e citocinas inflamatórias em Transtorno do espectro do autismo (TEA). Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências “Júlio de Mesquita” UNESP – Marília (SP) para obtenção do título de Mestre em Fonoaudiologia, área de concentração Distúrbios da Comunicação Humana.

Aprovada em 29 de abril de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Luciana Pinato – Faculdade de Filosofia e Ciências – FFC/ UNESP
Marília/SP. Orientadora e Presidente da Banca.

Prof. Dr. Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes – Universidade de São Paulo – USP - São Paulo.

Profa. Dra. Roberta Gonçalves da Silva – Faculdade de Filosofia e Ciências – FFC/UNESP - Marília/SP.

Apoio: Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (proc. 2011/15713-7 - bolsa de mestrado)

Dedico este trabalho aos meus amores,
pacientes incríveis, que me dedicaram seu
autístico amor.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora professora Dra. Luciana Pinato pelas orientações e conselhos durante o processo do Mestrado.

As professoras Dra. Célia Maria Giacheti e Dra. Dionísia Aparecida Cusin Lamônica que disponibilizaram tempo e sabedoria para contribuir para este trabalho.

Aos membros da banca, Dra. Roberta Gonçalves Silva e Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes, por disponibilizarem seu tempo para colaborar na construção desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Agradeço esta instituição pela bolsa de mestrado concedida (proc. 2011/15713-7) e pelo projeto Jovem pesquisador (proc. JP2011/51495-4) concedido à orientadora deste estudo.

Para toda minha família, especialmente, meu pai Darcy, minha mãe Natália, minha irmã Vanessa e minha sogra Maria José.

A professora Dra. Agnes Fetti-Conte pelos ensinamentos em palestras e pelas discussões sobre o diagnóstico no Transtorno do espectro do autismo.

Ao professor Dr. Edson Luiz Maistro por disponibilizar seu laboratório.

A funcionária Larissa Zochio por me ajudar constantemente na manipulação dos materiais coletados. Muito obrigada.

Aos Professores Dra. Larissa Cristina Berti e Dr. Vitor Engrácia Valenti, um agradecimento especial, pela colaboração na análise dos dados e o uso de ferramentas estatísticas.

A psicanalista Heloisa Teixeira, por me ajudar a estar mais próxima de mim mesma.

Às minhas companheiras de barco e amigas, Carla Taxini, Giulia Ganthous, Natália Fusco, Aline Schmatz e Denise Cunha pela cumplicidade em momentos de dor e prazer e por vivenciar comigo a procura por respostas às simples questões da vida.

Meus amigos Itapevenses que estiveram ao meu lado sempre, Rodrigo (Quick), Taci, Felipe, Vanessa, Murylo (Parça).

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Meu agradecimento mais profundo só poderia ser dedicado a uma pessoa: Meu esposo. O tempo todo ao meu lado, incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros neste último ano, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Obrigada André, meu AMOR.

Autístico amor

Nunca tive seu olhar,
Magia, círculos, tornados,
Brisa, vendaval,
Choros, risos,
Sou seu bambolê,
giro, giro...
Estou próximo à você...
mas somente meus giros te encantam,
mas não sinto teu toque,
Não tenho teu olhar,
Mesmo assim sigo girando em torno de
você,
Você é quem conduz,
bailarina, borboleta, fada...
Sou tudo o que a tua fantasia criar,
Aprendi que esta é tua forma de amar...
Tocar...
olhar...
Aceito, amo...
Entendo...
Teu autístico amor.

Rita Cherutti

RESUMO

FADINI, C. C. **Correlação entre 6-sulfatoximelatonina, distúrbios do sono e citocinas inflamatórias em Transtorno do espectro do autismo (TEA)**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências “Júlio de Mesquita” UNESP – Marília (SP) para obtenção do título de Mestre em Fonoaudiologia, área de concentração Distúrbios da Comunicação Humana.

O Transtorno do espectro do autismo (TEA) é um conjunto de afecções do neurodesenvolvimento que comprometem principalmente a interação social, a comunicação e o comportamento. Na sintomatologia do TEA destaca-se a alta prevalência de distúrbios severos no ritmo sono-vigília. Uma das possíveis causas de problemas na qualidade do sono em crianças seria o padrão anormal da produção de melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, capaz de modular a qualidade do sono, graças à sua função como transdutora da informação fotoperiódica ambiental, além disso, esta molécula é controlada por moléculas que sinalizam inflamação. O presente estudo correlaciona o conteúdo do metabólito da melatonina, 6-Sulfatoximelatonina (aMT6s) à distúrbios do sono e às citocinas TNF e IL-6 em TEA. Participaram do estudo 36 indivíduos, de ambos os gêneros, idade entre 4-18 anos (média de 9,7 +/- 4,1), divididos em **Grupo pesquisa (GP)**: 18 indivíduos com TEA e **Grupo controle (GC)**: 18 indivíduos controles. Dentre os indivíduos do GP, quanto ao diagnóstico, 56% apresentaram autismo, 17% PDD-NOS (Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação) e 28% síndrome de Asperger. Para a caracterização dos distúrbios do sono e comportamento foi utilizada a Escala de Distúrbios do Sono em Crianças e para caracterização do comportamento o inventário comportamental Child Behavior Checklist

– CBCL. As quantificações dos conteúdos de aMT6s e das citocinas TNF e IL-6 foram realizadas em urina e saliva, respectivamente, ambos por ELISA. Para análise dos dados foi utilizado estatística descritiva, comparação entre dois grupos por meio do *Mann-Whitney U test* e análise da relação entre as variáveis utilizado o Coeficiente de Correlação linear de Spearman., cujo o valor de significância adotado foi de 5%. Os resultados da EDSC mostraram que 44% dos indivíduos do GP apresentaram pelo menos um dos distúrbios do sono da escala, sendo que o GP apresentou score maior que o GC no distúrbio de início e manutenção do sono. Na análise do comportamento, o GP apresentou maiores escores em comparação ao GC para os problemas totais de comportamento, problemas de retraimento, problemas sociais, problemas de pensamento e problemas de atenção. Na análise da correlação entre os distúrbios do sono da EDSC e o inventário comportamental CBCL, verificou-se que os distúrbios do sono influenciaram negativamente nos problemas do pensamento, internalizantes e totais do comportamento de indivíduos do GP. Na comparação da aMT6s o GP apresentou menor conteúdo noturno que o GC. Na análise de correlação entre os resultados da aMT6s e os distúrbios de sono houve correlação entre conteúdo de aMT6s e presença de distúrbios respiratório do sono. Os valores encontrados no teste de verificação de ritmicidade circadiana do conteúdo de aMT6s mostraram que dos 18 indivíduos do GP, 49% apresentaram ritmicidade circadiana normal, 11% apresentaram ritmicidade invertida com o pico no período diurno e 40% não apresentaram ritmicidade. No GC, 100% dos indivíduos apresentaram ritmicidade circadiana normal do conteúdo de aMT6s. Houve correlação entre distúrbios de sono e o conteúdo de aMT6s. A análise dos valores de TNF não apontou variação de ritmo (dia/noite) nos indivíduos do GP e GC. Na comparação entre grupos o GP apresentou conteúdo de TNF noturno maior quando comparado ao GC. Os

resultados permitem concluir que indivíduos do GP apresentaram baixos níveis de aMT6s noturno em comparação ao GC, o que representa baixo conteúdo de melatonina plasmática nesta população neste período. Embora, não tenhamos encontrado correlação estatística, TNF esteve significativamente aumentado nos indivíduos do GP em comparação a indivíduos do GC, enquanto a citocina IL-6 apresentou níveis semelhantes ao controle. Os resultados nos permitem concluir que indivíduos com TEA apresentam baixos níveis de aMT6s noturna, esta baixa produção de melatonina influencia na qualidade do sono e pode ser causada pelos altos níveis de TNF circulante dos mesmos.

Palavras-chave: Autismo. Melatonina. Sono-vigília. Comportamento. Citocinas. Neuroinflamação. Transtorno do Espectro do Autismo.

ABSTRACT

The autism spectrum disorder (ASD) is a group of neurodevelopmental disorders that involve mainly social interaction, communication and behavior. On the symptomatology of ASD highlights the high prevalence of sleep-wake cycle disturbances. One of the causes of sleep disturbances in children is the abnormal pattern in the melatonin production by the pineal gland. This hormone can modulate the quality of sleep due to its function as transducing photoperiodic information from the environment. Besides being controlled by the photoperiodic information melatonin synthesis also is controlled by signaling molecules inflammation. The present study correlates sleep disorders with the contents of aMT6s, TNF and IL-6 in TEA. 36 individuals, of both genders, aged 4-18 years (mean 9.7 ± 4.1), were analyzed being 18 individuals with ASD (research group - GP) and 18 control subjects (control group-GC). In the GP regarding the diagnosis, 56% had autism, 17% PDD-NOS (Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified) and 28% Asperger syndrome. For the sleep disorders and behavior characterization were used respectively the Escala of Sleep Disorders in Children (ESDC) and Child Behavior Checklist - CBCL. The measurements of aMT6s, TNF and IL-6 contents were performed on urine or saliva by ELISA. For data analysis we used descriptive statistics, Mann-Whitney U test for comparison between two groups and linear correlation coefficient of Spearman, the value of significance was 5%. The ESDC showed that 44% of GP individuals have at least one type of sleep disorder, and the GP has higher scores than the CG in the disorder of onset and sleep maintenance. Individuals of the GP had higher scores compared to the GC for total behavior problems, withdrawal problems, social problems, thought and attention problems. In the analysis of the correlation between sleep disorders

and behavioral inventory, it was found that sleep disorders influenced negatively the thinking problems, internalizing and total behavior in the GP. Comparing the contents of diurnal and nocturnal aMT6s, the GP showed the lowest values. Furthermore 49% of GP showed normal circadian rhythmicity, 40% didn't show, and 11% had inverted rhythmicity. 100% of the GC showed normal circadian rhythmicity. The analysis of the values of TNF showed no difference between day / night in the GP and GC. The highest content of TNF was in the GP when compared to CG. There was no difference when comparing the amounts of IL-6 in the individuals of GP and GC. There was correlation between aMT6s content and the presence of sleep respiratory disorders. The results showed that the GP individuals had low levels of aMT6s at night compared to the GC. TNF was significantly increased in individuals of GP compared to individuals of the GC, while the cytokine IL-6 showed similar levels of control.

Keywords: Autism. Melatonin. Sleep-wake. Behavior. Cytokines. Neuroinflammation. Autism Spectrum Disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição (%) dos indivíduos do grupo pesquisa (GP) e do grupo controle (GC) classificados como portadores de distúrbios do sono segundo a escala EDSC.

Figura 2 - Análise comparativa entre a média \pm EPM dos valores alcançados em cada classificação de distúrbios do sono da EDSC no GP e GC.

Figura 3 - Análise comparativa entre a média \pm EPM dos escores de cada escala do comportamento encontrados no inventário comportamental CBCL entre GP e GC.

Figura 4 - Número de indivíduos que apresentaram os respectivos problemas de comportamento nas escalas do CBCL nos grupos GP e GC.

Figura 5 - Correlação entre os escores totais da EDSC e os problemas do comportamento no grupo GP e GC.

Figura 6 - Análise comparativa entre a média \pm EPM do conteúdo de 6-Sulfatoximelatonina (aMT6s) nos períodos diurno, noturno e acumulado em 24h do GP e GC .

Figura 7 - Conteúdo de aMT6s (ng de aMT6s / mg de creatinina) divididos em intervalos de 6h em GP e GC.

Figura 8 - Distribuição (%) dos indivíduos do GP e do GC com padrão de variação circadiana do conteúdo de aMT6s.

Figura 9 - Análise comparativa entre as médias \pm EPM do conteúdo salivar de TNF (pg/ml) do GP e GC.

Figura 10 - Correlação entre aMT6s e os distúrbios do sono no GP e GC .

Figura 11 - Correlação entre aMT6s e TNF no GP e GC.

Figura 12- Correlação entre aMT6s e IL-6 no GP e GC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do grupo pesquisa quanto à idade, gênero, uso de medicamentos e procedência.

Tabela 2 – Valores de média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e valor de p dos indivíduos do GP e GC na Escala de distúrbios do sono para Crianças (EDSC)

Tabela 3 – Valores de média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e valor de p dos indivíduos dos grupos: controle (GC) e pesquisa (GP) na escala CBCL, *p < 0.05.

Tabela 4. Parâmetros circadianos obtidos por meio do COSINOR para o conteúdo de aMT6s utilizando-se 72 horas de coleta.

LISTA DE ABREVIATURAS

Transtorno do espectro do autismo (TEA)

Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID)

Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação (PDD-NOS)

Padrões moleculares associados a Patógenos (PAMPs)

6-Sulfatoximelatonina (aMT6s)

Classificação Internacional de Doenças (CID)

Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM)

Autism Spectrum Disorders (ASD)

Sistema Nervoso Central (SNC)

Interleucina 1-beta (IL-1 β)

Interleucina 6 (IL-6)

Fator de necrose tumoral (TNF),

NF κ B (fator de transcrição nuclear kappa B)

Interferon-gama (IFN- γ)

Fator inibidor de macrófagos (MIF)

Interleucina 8 (IL-8)

Núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQ)

Arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT),

Hydroxyindole O-methyltransferase (HIOMT)

Acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT)

Eixo hipotálamo – hipófise – adrenal (HHA)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18-21
2 .REVISÃO DA LITERATURA	22-22
2.1 Transtorno do espectro do autismo	22-25
2.2 Sistema imune em TEA	25-28
2.3. Glândula pineal e melatonina	28-31
2.3 Melatonina em TEA	31-36
3. OBJETIVO	37-37
3.1 GERAL	37-37
3.2 ESPECÍFICOS	37-37
4. MÉTODO	38-38
4.1 Casuística	38-42
4.2 Instrumentos	42-42
4.2.1 Escala de Distúrbio do Sono em crianças (EDSC)	42-43
4.2.2 Caracterização comportamental	43-44
4.3 Coleta de urina para análise do conteúdo de 6-sulfatoximelatonina (aMT6s) e creatinina.	44-45
4.4 Coleta de saliva para análise das citocinas	45-45
4.5 Análise laboratorial	45-45
4.6 Avaliação do ritmo biológico de aMT6s	46-46
4.7 Análise dos Resultados	46-46
5. RESULTADOS	47-66
6. DISCUSSÃO	67-67
6.1 Caracterização dos distúrbios do sono e a influência destes no comportamento de indivíduos com TEA (GP) e controle (GC)	67-70
6.2 Quantificação do conteúdo de aMT6s e citocinas (TNF e IL-6) nos indivíduos com TEA (GP) e controle (GC)	70-74
6.3 Influência do conteúdo de aMT6s nos distúrbios do sono e nas citocinas TNF e IL-6 em indivíduos com TEA (GP) e controle (GC)	75-76
7. CONCLUSÃO	77-77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78-88
ANEXOS.....	89-91

1 INTRODUÇÃO

Os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID), do inglês Pervasive Developmental Disorders (PDD), fazem parte de um grupo de doenças neuropsiquiátricas da infância (STEINE; GUERREIRO; MARQUES-DE-FARIA, 2003). São condições que interferem no desenvolvimento neuropsicológico do indivíduo, e se caracterizam por prejuízo grave na capacidade de interação social, comunicação verbal e não verbal e padrões estereotipados e repetitivos de comportamentos e interesses (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002).

Autismo, Síndrome de Asperger, Síndrome de Rett, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação (Pervasive Developmental Disorders, Not Otheerwise - PDD-NOS) são diagnósticos que compõem os TID (APA, 2002; STEINE; GUERREIRO; MARQUES-DE-FARIA, 2003).

Devido à dificuldade no diagnóstico diferencial ser maior entre Autismo, Síndrome de Asperger e PDD-NOS, estas três condições foram incluídas em um subgrupo denominado Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) (RUTTER, 2005; FETTE-CONTE, 2011), cuja prevalência varia de 3 para cada 10.000 nascimentos até 66 para 10.000 nascimentos na população em geral dependendo do estudo (AUTISM AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES MONITORING NETWORK, 2009). Sabe-se que este transtorno afeta 4 vezes mais meninos do que meninas (BAIRD et al., 2006) e sua susceptibilidade pode ser atribuída a influências genéticas heterogêneas em grande parte, ainda desconhecidas (FOLSTEIN; ROSEN-SHEIDLEY, 2001; WIROJANAN et al., 2009).

Alguns trabalhos sugeriram uma combinação entre fatores de risco ambientais, auto-imunes e inflamatórios no sistema nervoso central que poderiam contribuir para a

patogênese deste transtorno (NELSON; GREYER; CROEN, 2001; VARGAS et al., 2005; ZIMMERMAN et al., 2005; CHEZ et al., 2007).

Na sintomatologia do TEA foram descritos altos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), Interferon-gama IFN γ Interleucinas 1-beta (IL-1 β) e Interleucina 6 (IL-6) (ZIMMERMAN et al., 2005; MOLLOY et al., 2006; ASHWOOD; WAKEFIELD, 2006) com ativação aumentada de células Th2 e Th1, essenciais para o estabelecimento da resposta imune (MOLLOY et al., 2006; LI et al., 2009) o que reforça a hipótese da participação de processos inflamatórios nos quadros clínicos de indivíduos com TEA. Apesar disto, o processo inflamatório tem sido, até o momento, pouco explorado como possível alvo terapêutico em TEA.

Dentre a complexa sintomatologia do TEA destaca-se ainda a alta prevalência de distúrbios de sono, acompanhadas de alterações comportamentais, instabilidade de humor, déficits nas funções neurocognitivas, incluindo memória, atenção, criatividade verbal, flexibilidade cognitiva e raciocínio abstrato (LEU et al., 2011; GUÉNOLÉ et al., 2011; DOYEN et al., 2011).

Em indivíduos saudáveis, em condições ambientais normais, a síntese e secreção de melatonina pela glândula pineal são altas durante a noite e baixa durante o dia (SIMMONEAUX; RIBELAYGA, 2003). Alguns estudos apontaram problemas neste ritmo de melatonina em TEA, alguns relataram amplitude diminuída a noite ou até mesmo ausência de secreção noturna e um deles apresenta autistas com níveis de melatonina elevados durante o dia (RITVO et al., 1993; NIR et al., 1995; JAN; FREEMAN; FAST, 1999; MYAMOTO et al., 1999; RICHDALÉ, 1999; NIR, 2003; JAN; FREEMAN, 2004).

Considerando que, em condições normais a produção noturna de melatonina começa em consonância com o aumento na propensão ao sono, deficiências na consolidação do

sono são correspondentes à fase circadiana de menor secreção de melatonina e que a melhora na qualidade do sono coincide com os maiores níveis de melatonina (TZISCHINSKY et al., 1993; SCHOCHAT et al., 1998), a alteração no ritmo de melatonina poderia ser responsável pela dificuldade no início e manutenção do sono em TEA (PATZOLD; RICHDALE; TONGE, 1998; RICHDALE, 1999).

Na última década foi demonstrado que além do controle fotoperiódico sobre a produção de melatonina, a síntese deste hormônio pela glândula pineal pode ser suprimida por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e por citocinas pró-inflamatórias, criando as condições para uma montagem da resposta inflamatória apropriada, independente da hora do dia (Markus et al., 2007., Da Silveira Cruz-Machado et al., 2010, Carvalho-Souza et al., 2011). Neste contexto, a melatonina passa a ser produzida por células imunocompetentes no local da injúria onde age como molécula imunomodulatória. Na fase de resolução da resposta inflamatória, mediadores anti-inflamatórios contribuem para a restauração da atividade da glândula pineal (Markus et al., 2007).

Avaliações dos conteúdos de melatonina ou de seu metabólito 6-Sulfatoximelatonina (aMT6s) demonstraram que a produção de melatonina encontra-se alterada com baixa produção de melatonina à noite em indivíduos com TEA (JAN; O'DONNEL, 1996; MYAMOTO et al., 1999; LEU et al., 2010). Isto pode ser uma forte evidência de que o processo inflamatório pode estar bloqueando a produção noturna de melatonina nestes indivíduos.

Além disso, a literatura até o momento aponta a melatonina como um tratamento promissor para distúrbios do sono em TEA, o que pode inclusive levar a melhora sensível dos problemas comportamentais (GALLI-CARMINATI; DERIAZ; BERTSCHY, 2009;

WIROJANAN et al., 2009). Devemos ainda ressaltar que as pesquisas, até o momento, exploram apenas a função cronobiótica da melatonina, enquanto as funções antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora, além de aprimoramento de estabilidade dendrítica da melatonina (TAMURA et al., 2006; KAUR; LING, 2008; REITER et al., 2009; TAMURA et al., 2009; LI et al., 2009; CECON et al., 2010), não foram ainda consideradas em TEA.

Vários trabalhos têm proposto função anti-inflamatória para a melatonina quer seja exógena (TAN et al., 2010; TOMA´S-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005) ou endógena (TAMURA et al.,2006). Além disso, estudos avaliando a adaptação da resposta imune sugeriram que a melatonina secretada pela glândula pineal desempenha um papel na regulação das respostas imunes inatas e adquiridas (DEMAS; NELSON, 2006; SZCZEPANIK, 2007; BAILLIE; PRENDERGAST, 2008).

Neste estudo investigamos os níveis de melatonina em indivíduos com TEA e os correlacionamos à distúrbios do sono e à citocinas inflamatórias com o intuito de corroborar para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na sintomatologia do TEA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO

O termo “autismo” foi apresentado pela primeira vez pelo psiquiatra suíço Eugene Bleuler em 1911, para designar um grupo de indivíduos esquizofrênicos com perda de contato com a realidade e com grande dificuldade ou impossibilidade de comunicação (AJURIAGUERRA, 1977; RAPIN; TUCKMAN, 2009). Posteriormente, Leo Kanner, em 1943, descreveu crianças aparentemente normais, mas com alterações comportamentais que se repetiam e permaneciam inalteradas ao longo do tempo: apego completo às rotinas do dia-a-dia, isolamento extremo e preferência por objetos inanimados em detrimento das pessoas. Estas crianças apresentavam ainda, alterações complexas da linguagem, além da ecolalia imediata e tardia e a inversão pronominal. Esse conjunto de sinais e sintomas foi designado por Kanner (1944) como Autismo Infantil Precoce. No mesmo ano (1944), Hans Asperger descreveu um grupo de adolescentes “autistas” com uma série de comportamentos peculiares, semelhantes às descritas por Kanner, mas que ao contrário, apresentavam um quadro de desenvolvimento de linguagem preservado.

Wing (1981) comparando os trabalhos de Kanner e Asperger descreveu o autismo como um transtorno específico sintomatológico dependente do comprometimento cognitivo, o que reforçou a tendência de considerar o autismo não como uma entidade única, mas sim como um grupo de transtornos, que compõem um “*continuum*” autista que pode abranger, desde os quadros que caracterizam um autismo mais severo, até aqueles com potencial mais preservado, como o encontrado na síndrome de Asperger.

Na oitava edição da CID (Classificação Internacional de Doenças) o autismo foi citado como uma forma de esquizofrenia e na nona edição passou a ser classificado como uma psicose infantil. No DSM-III-R (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais), o termo TID foi sugerido pela primeira vez e incluído em uma nova classe de transtornos, os transtornos invasivos do desenvolvimento (TIDs) refletindo o fato de múltiplas áreas cognitivas de funcionamento serem afetadas no autismo e nas condições a ele relacionadas. Esta terminologia também foi adotada na décima revisão CID (CID-10) (RAPIN; TUCKMAN, 2009).

No DSM-IV, os novos critérios de diagnóstico para o autismo, bem como as várias condições candidatas a serem incluídas na categoria TIDs, foram avaliados e caracterizadas por prejuízos qualitativos nas áreas de comunicação, interação social e padrões restritos e repetitivos de comportamentos e interesses. Nos TIDs, ainda foram inclusos a Síndrome de Rett, a Síndrome de Asperger, o transtorno desintegrativo da infância e os transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação (do inglês- *Pervasive Developmental Disorder not otherwise specified* - PDDNOS) (APA, 1994). O DSM-IV-TR não trouxe mudanças quanto aos critérios de diagnóstico (ELIAS, 2005).

Na CID-10, o número de transtornos agrupados difere do DSM-IV. O termo infantil é mantido ao conceito de autismo e os TIDs (F84) estão inseridos no diagnóstico dos Transtornos do Desenvolvimento Psicológico (F80-89) e estão assim caracterizados: Autismo Infantil (F84.0); Autismo Atípico (F84.1); Síndrome de Rett (F84.2); Outro Transtorno Desintegrativo da Infância (F84.3); Transtorno de Hiperatividade Associado ao Retardo Mental e Movimentos Estereotipados (F84.4); Síndrome de Asperger (F84.5); Outros Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (F84.8); Transtorno Invasivo do Desenvolvimento, não-especificado (F84.9).

Atualmente, devido à heterogeneidade dos sintomas existentes entre autismo, Síndrome de Asperger e PDDNOS tornou-se comum o uso do termo “Transtorno do espectro do Autismo” (TEA), ou o termo em inglês, “*Autism Spectrum Disorders*” (ASD) para se referir a estas três condições de TIDs (VEENSTRA-VANDERWEELE; COOK, 2004). A síndrome de Asperger encontra-se no extremo mais leve de manifestações do TEA e difere das demais categorias principalmente por um atraso leve na comunicação verbal e por não haver prejuízo significativo do desenvolvimento cognitivo (GILBERG, 1998a). Já o diagnóstico de PDD-NOS é dado nos casos em que os critérios para a classificação como autismo não são satisfeitos em vista de seu início tardio ou sintomatologia atípica. A detecção do transtorno pode ocorrer geralmente antes dos três anos de idade, sendo algumas manifestações perceptíveis já aos seis meses de idade (FOMBONNE, 2005). O TEA é clinicamente definido, não existindo exames laboratoriais comprobatórios que orientem o diagnóstico. A tendência dos últimos anos na Psiquiatria como um todo é a criação de instrumentos (questionários ou escalas) que, por meio da observação direta ou de perguntas direcionadas, possam estabelecer parâmetros mensuráveis e sirvam como ferramentas para orientar o diagnóstico clínico (SATO, 2008).

A etiologia do TEA ainda não foi esclarecida embora as evidências mais recentes sugiram que fatores genéticos, neurológicos, ambientais e imunes estejam envolvidos (PARDO; EBERHART, 2007). Considera-se a participação de vários sistemas fisiológicos e metabólicos como: alteração no sistema imunológico, inflamação, exposições ambientais tóxicas e sistemas regulação redox / estresse oxidativo e de geração de energia / mitocôndrial. Neste contexto, o TEA pode surgir de, ou pelo menos, envolver, anomalias fisiológicas sistêmicas, que vão além do Sistema Nervoso Central (SNC) (STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2010).

Dentre as possíveis influências ambientais que aumentariam o risco do TEA estão injúrias pré ou perinatais, toxicidade ao mercúrio e infecções virais persistentes que poderiam se iniciar *in utero*, e, em consequência, contribuir para alterações no SNC e em outros sistemas em desenvolvimento (WING, POTTER, 2002; LARSSON et al., 2005).

2.2 SISTEMA IMUNE E TEA

O sistema imune é constituído por células e moléculas responsáveis por reconhecer organismos estranhos invasores, impedir sua disseminação e finalmente eliminá-los do corpo (PARHAM, 2001). Atualmente, evidências experimentais demonstram que o SNC interfere na resposta imunológica e que essa também exerce influência sobre este sistema, criando-se assim, uma interação entre tais sistemas que atuam modulando-se reciprocamente (BUTTS; STENBERG, 2008).

A inflamação é uma destas respostas imunológicas desencadeada por lesões infecciosas, traumáticas ou tóxicas (PERRY et al., 1995) e se caracteriza pela mobilização de células do sistema imune, alterações da permeabilidade vascular, sensibilização de terminações nervosas e produção de moléculas denominadas mediadores inflamatórios (WILLIAMS, 1983). Alguns destes mediadores são capazes de estimular células do SNC como os astrócitos, oligodendrócitos, neurônios (CORREALE; VILLA, 2004) e principalmente a microglia que passa a desempenhar funções de fagocitose e liberação de outros mediadores como as interleucinas 1-beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) e a citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral (TNF), contribuindo assim para o desenvolvimento e modulação da resposta inflamatória (LAFRANCE et al., 2010). As

respostas neuroimunoendócrinas desencadeadas por este processo resultam em alterações comportamentais como redução de atividade e interação social, em perda de apetite e em alterações metabólicas e da temperatura corporal (PERRY, 2004).

O mecanismo intracelular pelo qual moléculas que sinalizam ou que promovem a montagem da resposta inflamatória como o TNF e IL-6 pode envolver a participação do fator de transcrição NFκB (fator de transcrição nuclear kappa B), um importante regulador de processos fisiológicos e fisiopatológicos (KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2000; KUMAR et al., 2004; WONG; TERGAONKAR, 2009) como as respostas imunes inata e adquirida, os processos de proliferação celular (BONIZZI; KARIN, 2004; GRAHAM; GIBSON, 2005), morte celular (SUN; LEY, 2008), neuroproteção e neurodegeneração (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997; BHAKAR et al., 2002; FRIDMACHER et al., 2003).

O NFκB é um fator de transcrição cuja atividade é regulada pela sua translocação citoplasma-núcleo. Em células não estimuladas este fator está retido no citoplasma devido ao mascaramento da seqüência sinalizadora de localização nuclear (NLS; do inglês: nuclear localization signal) por proteínas inibitórias conhecidas como IκB (KARIN; BEN-NERIAH, 2000). A ativação das células por fatores injuriantes, tais como citocinas pró-inflamatórias, produtos bacterianos e virais, agentes mitogênicos ou estresse oxidativo leva a ativação de proteínas quinases que resulta na fosforilação da IκB. IκB fosforilada em um resíduo de serina da porção N-terminal é ubiquitinada e degradada expondo a seqüência de peptídeos NLS que é reconhecida pela maquinaria de importação ao núcleo. NFκB é então rapidamente transportado para o núcleo regulando a expressão de genes dependentes deste fator (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997). Esta é uma via de sinalização clássica na resposta inflamatória e promove a transcrição de um pacote de

genes necessários para a montagem e término deste processo de defesa do organismo. Assim, na fase inicial são ativados mecanismos capazes de combater a injúria e em seguida o processo deve ser desativado para que não haja agressão ao próprio organismo. Entre as proteínas cuja expressão é induzida por NFκB pode-se mencionar citocinas pró e anti-inflamatórias, enzimas como a sintase de óxido nítrico induzida (iNOS), ciclooxigenase II e o receptor de bradicinina B1 (EL SAYAH et al., 2006).

Ressalta-se que os efeitos intracelulares da IL-6 também são induzidos principalmente por meio da ativação da via JAK/STAT, onde o heterodímero IL-6R-GP130 ativa principalmente a janus quinase 2 (JAK2), que após ser fosforilada, ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição STAT-3 (HEIRINCH et al., 1998; LEBRUN VAN OBBERGHEN, 2008).

Anomalias do sistema imune são freqüentemente descritas entre os indivíduos com TEA como a presença de anticorpos reativos contra moléculas do SNC, número alterado de linfócitos T *helper*, redução das concentrações plasmáticas de imunoglobulinas (anticorpos), aumento das concentrações plasmáticas de proteínas do complemento, diminuição do número de linfócitos, ativação de células NK e aumento da resposta de monócitos e presença de quadro inflamatório com alteração das concentrações plasmáticas de citocinas (ASHWOOD; WAKEFIELD, 2006; LI et al., 2009; ASHWOOD, 2011).

O aumento das citocinas TNF-α, IL-6, interferon-gama (IFN-γ) e interleucina 8 (IL-8) já foi descrito nos encéfalos de indivíduos com TEA que apresentariam uma resposta imune exacerbada, provavelmente associada à inflamação crônica cerebral (ZIMMERMAN et al., 2005; MOLLOY et al., 2006; ASHWOOD; WAKEFIELD, 2006, LI et al., 2009).

Outra citocina envolvida com o TEA é o fator inibidor de macrófagos (MIF), que é construtivamente expresso no tecido cerebral e exerce importante influência sobre o sistema neuroendócrino. Estudos genômicos demonstraram um polimorfismo na região codificadora de MIF em indivíduos autistas que apresentam altas concentrações plasmáticas de MIF, correlacionadas à intensidade das alterações comportamentais observadas (GOINES; VAN DE WATER, 2010).

Além dos dados quantitativos sobre a presença de elevadas concentrações de marcadores inflamatórios no sangue e no líquido (HEIJNEN; KAVELAARS, 2010), a própria semelhança dos sintomas comportamentais presentes durante quadros de doenças infecciosas com sintomas do TEA, suscitam a hipótese de que as citocinas e mediadores inflamatórios estão envolvidos na fisiopatologia destas doenças e sugerem fortemente que a modulação de tais citocinas pode vir a ser uma ferramenta terapêutica para indivíduos com TEA.

2.3 GLÂNDULA PINEAL E MELATONINA

A glândula pineal, órgão impar presente em todos os vertebrados, é composta principalmente por pinealócitos, mas também por astrócitos e microglia dispersos entre capilares e axônios (BURKITT; YOUNG; HEATH, 1994). Parte integrante do sistema de temporização interna, onde os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQ) abrigam o oscilador central dos ritmos circadianos, a glândula pineal, por outro lado, é responsável pela transdução da informação fóptica ambiental para o corpo. Isto envolve um mecanismo de inibição e de desinibição da via de síntese de seu principal hormônio, a melatonina (SIMMONEAUX; RIBELAYGA, 2003).

A síntese de melatonina na glândula pineal se dá a partir da acetilação da serotonina pela ação da enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT), originando o precursor N-acetilserotonina (NAS) que é metilado em 5-metoxi-N-acetilriptamina (melatonina) pela enzima Hydroxyindole O-methyltransferase (HIOMT) também conhecida como acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT) (GALLI-CARMINATI et al., 2009; JOHNSON, MALOW, 2008).

A informação fótica ambiental que desencadeia a produção de melatonina é a mesma que sincroniza os NSQ à alternância claro-escuro ambiental (KAUR, LING, 2008; CECON et al., 2010). A informação fótica alcança os NSQ pelo trato retino-hipotalâmico que segue por uma via polissináptica envolvendo projeções eferentes do NSQ que alcançam o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Este se conecta com a coluna intermediolateral da medula, de onde são emitidas fibras simpáticas aferentes a pineal que por meio da liberação de noradrenalina induzem a produção de melatonina. Esta via é inibida pela luz, de modo que à noite a síntese de melatonina é desencadeada resultando em um perfil dos níveis plasmáticos deste hormônio com aumento após o anoitecer (entre 20:00h e 23:00h), pico de secreção no meio da noite (entre 2:00h e 4:00h, 60 a 70 pg/ml) e queda nas primeiras horas da manhã (entre 8:00h e 10:00h). O mesmo perfil pode ser observado analisando-se os níveis urinários do principal metabólito da melatonina, a 6-Sulfatoximelatonina (aMT6s) (JOHNSON; MALOW, 2008).

A melatonina produzida é distribuída tanto para a corrente sanguínea quanto para o líquido cefalorraquidiano, marcando o escuro nestes dois importantes compartimentos de distribuição (MOZAFFARI, ABDOLLAHI, 2011). Esta condição dá a melatonina o status de marcador do escuro para todos os sistemas do corpo e assim a relaciona diretamente à

nossa qualidade de sono (REITER et al., 2000; EIKELENBOOM et al., 2002).

Seguindo este raciocínio, baixos níveis plasmáticos de melatonina poderiam favorecer a ocorrência de distúrbios de sono e isto poderia ser causado por diversos fatores que possam alterar a via de síntese deste hormônio.

Apesar do controle da síntese de melatonina ser orquestrado pela sincronização ao meio externo, recentes evidências apontam que esta síntese também é modulada por fatores internos (WITHYACHUMNARNKUL et al., 1990, 1991; TSAI; MCNULTY, 1999; TSAI et al., 2001a, b; FERREIRA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006; FERNANDES et al., 2009). Além de polimorfismos nas principais enzimas da via, estudos recentes têm investigado possíveis fatores e mecanismos que poderiam atuar nessa inibição. Dentre eles, estão agentes pró-inflamatórios como citocinas liberadas em situações de injúria que alcançariam a glândula e agindo via receptores desencadeariam uma cascata de eventos que culminaria na inibição da via de síntese (FERNANDES et al., 2006; MARKUS et al., 2007). A cascata intracelular envolve a participação do NF κ B, que possui função central na resposta inflamatória e que está expresso de maneira constitutiva na glândula pineal (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010; CARVALHO-SOUSA et al., 2011). Neste contexto, a glândula pineal atuaria como um sensor interno capaz de detectar e responder a agentes moduladores de processos fisiopatológicos. Isto teria importância fundamental na montagem da resposta inflamatória, já que além da função cronobiótica, a melatonina possui amplo leque de funções, dentre as quais a função anti-inflamatória por inibir a migração de leucócitos. Assim, em doses fisiológicas, a melatonina poderia impedir a migração de leucócitos para o local de injúria impedindo a montagem da resposta inflamatória (LOTUFO et al., 2001; MARKUS et al., 2007).

A constatação da existência desta comunicação entre o sistema immune e a glândula pineal serviu como base para a elaboração do conceito de um eixo immune-pineal. O eixo imune-pineal é uma proposta que surge como uma nova abordagem da interação entre o sistema imunológico e a organização temporal interna, propondo que os dois sistemas são capazes de uma comunicação recíproca. A supressão da produção de melatonina na glândula pineal mediada por moléculas que sinalizam, ou que promovem a montagem da resposta inflamatória, seria um fator facilitador da migração de leucócitos (LOTUFO et al., 2001; MARÇOLA et al., 2012). Após migrarem, estas células passariam a produzir melatonina no local do processo inflamatório (FINOCCHIARO et al., 1988; CARRILLO-VICO et al., 2004, MARTINS et al., 2004, PONTES et al., 2006). Uma vez que a síntese extra-pineal de melatonina pode atingir altas concentrações nos locais de produção, esta indolamina seria capaz de exercer seus efeitos antioxidantes/anti-inflamatórios, contribuindo com a fase de recuperação da resposta inflamatória (JAWOREK et al., 2005; MARKUS et al., 2007). Além disso, o aumento de glicocorticóides circulantes durante a fase de recuperação seria um sinal positivo que contribuiria para o retorno da síntese de melatonina pela glândula pineal (FERREIRA et al., 2005; MARKUS et al., 2007; FERNANDES et al., 2009).

2.4 MELATONINA E TEA

No campo das pesquisas em TEA, a melatonina originalmente chamou a atenção como possível contribuinte para a etiologia baseado na hipótese de que sua hipersecreção poderia resultar em uma cascata de efeitos de desajustes neurohormonais no eixo hipotálamo – hipófise – adrenal (HHA) (GARSTANG; WALLIS, 2003), entretanto esta

hipótese fracassou quando o monitoramento de 24h dos níveis plasmáticos desta molécula mostrou que indivíduos com TEA apresentam baixos níveis noturnos de melatonina em comparação a indivíduos controles (AMIR; STEWART, 1996; MELKE et al., 2008; LI et al., 2009). Similarmente, o conteúdo noturno de aMT6s na urina é baixo em relação aos controles (TORDJMAN et al., 2005; 2012). Dois destes trabalhos apresentaram autistas com níveis de melatonina elevados durante o dia (RITVO et al., 1993; NIR et al., 1995).

A causa dos baixos níveis de melatonina em TEA têm sido apontada como a baixa expressão e atividade da acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT) (TOMA et al., 2007; JONSSON et al., 2010; PAGAN et al., 2011) devido a mutações no gene da ASMT (JONSSON et al., 2010). Outros diversos genes importantes para a regulação dos ritmos circadianos, como os “clock genes”, tem sido estudados e apontados como possíveis causas da quebra de ritmicidade circadiana em indivíduos com TEA (NICHOLAS et al., 2007; HU et al., 2009). Além disso, resultado surpreendente mostra que níveis de melatonina em pais não afetados de pacientes com TEA estão alterados, o que também sugere uma condição genética para esta característica (MELKE et al., 2008).

Essa alteração no ritmo de melatonina pode ser responsável pelos distúrbios crônicos de sono em indivíduos com TEA, havendo especulações de que indivíduos com problemas para iniciar a fase de sono podem ter um ritmo de melatonina com pico no final da noite, enquanto a redução na amplitude do ritmo pode resultar na fragmentação do sono e no despertar antes do horário normal (JAN; O'DONNELL, 1996; PATZOLD; RICHDALE; TONGE, 1998; MYAMOTO et al., 1999; RICHDALE, 1999). Confirmando este fato, vários estudos sugerem que o uso de melatonina é eficaz no tratamento de distúrbios do sono em indivíduos com patologias neurológicas, distúrbios

de desenvolvimento e transtornos neuropsiquiátricos (AKABOSHI et al., 2000; HAYASHI, 2000; ROSS; DAVIES; WHITEHOUSE, 2002; JAN; FREEMAN, 2004).

A administração de melatonina exógena tem sido usada em pesquisas com TEA para o tratamento da insônia, com resultados positivos mostrando diminuição da latência do sono (ANDERSEN et al., 2008; PAAVONEN et al., 2009; WIROJANAN et al., 2009), melhoras significativas na duração e qualidade do sono e diminuição do despertar durante a noite (PAAVONEN et al., 2009; GUÉNOLÉ; BALEYTE, 2011). Estes indivíduos não só tiveram melhora na qualidade do sono, como consequentemente melhora durante a vigília nos aspectos cognitivos, comunicativos e comportamentais (GALLI-CARMINATI et al., 2009; ROSSIGNOL; FRYE, 2011)

Estudo com crianças com síndrome de Asperger, tratados com melatonina (3mg) durante 14 dias, mostrou melhora significativa em relação a medidas comportamentais durante a vigília quando a latência do sono diminuiu, mesmo sem mudanças na duração do sono (PAAVONEN et al., 2003; GARSTANG, WALLIS; 2003). Este resultado sugere que a melhora no comportamento diurno com a administração de melatonina noturna pode estar relacionada com efeitos da melatonina sobre fases específicas do ciclo sono-vigília.

Outros estudos clínicos mostram que com a administração de melatonina (0,75-6mg) 60% dos indivíduos apresentaram melhora significativa do sono e em 25% dos casos, segundo relatos dos pais, os distúrbios do sono desapareceram, 13% dos indivíduos crianças não sofreram alterações na sua qualidade de sono e, em 1% dos indivíduos, o sono piorou. Estudo duplo-cego, randomizado, cruzado controlado, envolvendo 22 indivíduos com diagnóstico de TEA, com insônia grave tratados durante 3 meses com placebo versus 3 meses de melatonina (dose máxima de 10 mg) mostrou que em todos os indivíduos que

completaram o estudo, a melatonina melhorou significativamente a latência do sono e tempo total de sono, mas que não influenciou no número de despertares noturnos (WRIGHT et al., 2011). Ainda, estudo com adultos com TEA relatou que a melatonina (3mg ao deitar) além de ser eficaz na redução da latência de início do sono foi benéfica nos despertares noturnos e na duração de sono (GALLI-CAMINATI et al., 2009).

Os mecanismos pelos quais a melatonina facilita o sono de indivíduos com TEA permanecem desconhecidos. As hipóteses são de que a melatonina sincronizaria os ritmos biológicos ou agiria como ansiolítico ou sedativo, ou ainda poderia atuar de forma não específica como um agente facilitador do sono, com efeitos opostos da adrenalina, reduzindo o ritmo cardíaco, relaxando a musculatura e diminuindo a temperatura corporal central (JOHNSON; MALOW, 2010).

Todos os estudos citados de uso exógeno de melatonina em TEA exploram apenas sua função cronobiótica, sem explorar seu amplo espectro de ações como as funções antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora, além de aprimoramento de estabilidade dendrítica (TAMURA; SILVA; MARKUS, 2006; KAUR; LING, 2008; REITER et al., 2009).

Recentemente estudos vêm propondo um papel imunomodulador para a melatonina nas diversas patologias que acometem o SNC, onde esta molécula estimula uma cascata de eventos que modificam os parâmetros séricos inflamatórios, melhorando o curso clínico de doenças com etiologia inflamatória (MOZAFFARI; ABDOLLAHI, 2011).

Estudos clínicos apontam a melatonina como um tratamento promissor em anóxia (BAGCI et al., 2011), doenças metabólicas e neurodegenerativas (PANDI-PERUMAL,

2012), epilepsia (BRIGO, DEL FELICE, 2012) câncer (MILLS et al., 2005), inflamações e envelhecimento (PANDI-PERUMAL, 2012), o que evidencia sua função imunomoduladora tanto como potente antioxidante na redução de radicais livres como por sua atividade anti-apoptótica (GUPTA et al., 2003).

Apesar de indivíduos com TEA apresentarem índices maiores de estresse oxidativo com redução dos níveis de antioxidantes, quando comparados a indivíduos controles, a melatonina ainda não foi utilizada em TEA como mecanismo de melhora destas anormalidades fisiológicas. Da mesma forma, apesar das evidências de inflamação em alguns indivíduos com TEA (PARDO, VARGAS, 2005; ASHWOOD et al., 2011; TOSTES et al., 2012) e do fato de a neuroinflamação danificar o tecido cerebral por meio de vários mecanismos, incluindo a formação de placas, o crescimento dos neurônios anormais, aumento e liberação de citocinas pró-inflamatórias (GUPTA et al., 2003), ainda permanece sem avaliação o possível efeito anti-inflamatório da melatonina em TEA.

Este estudo objetivou abordar ambos os aspectos da melatonina em TEA, como agente cronobiótico correlacionando-a com distúrbios do sono e como agente imunomodulatório correlacionando a com níveis de citocinas pró-inflamatórias. O estabelecimento destas correlações visa contribuir para futuras investigações farmacológicas no tratamento do TEA.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

- Correlacionar o conteúdo de melatonina, por meio da aMT6s, à distúrbios do sono e à citocinas inflamatórias em TEA.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e classificar os distúrbios do sono e os problemas do comportamento em indivíduos com TEA e seus respectivos controles;
- Correlacionar os distúrbios do sono aos problemas do comportamento de indivíduos com TEA e seus respectivos controles;
- Investigar o conteúdo de aMT6s e o padrão de ritmicidade em indivíduos com TEA e seus respectivos controles;
- Investigar o conteúdo das citocinas inflamatórias TNF e IL-6 em indivíduos com TEA e seus respectivos controles;

4 MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo clínico transversal, em conformidade com as Normas Regulamentadoras em Pesquisa em Seres Humanos, aprovado pelo CEP da Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília (Processo 1001/2011), (Anexo 1).

A participação dos indivíduos neste estudo foi vinculado ao aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo 2) pelos pais e/ou responsáveis, elaborado para fins específicos desta pesquisa, segundo recomendações da Resolução CNS 196/96.

4.1 Casuística

Foram avaliados e entrevistados 56 indivíduos provenientes das seguintes instituições: Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Marília (APAE-Marília) Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Bauru, (APAE-Bauru) e Associação de Pais e Amigos da Criança Autista e do Jovem Autista ou com Transtorno do Desenvolvimento (Espaço Potencia-Marília -SP) e de clínicas especializadas das cidades de Marília-SP e Bauru-SP, com fenótipo comportamental semelhantes ao Transtorno do Espectro do autismo. Destes, somente 28 indivíduos se enquadravam ao diagnóstico de TEA, segundo os critérios propostos pela CID-10 (Classificação Internacional de Doença OMS, 2000) e pelo DSM IV-TR (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª edição, texto revisado). Os diagnósticos do TEA foram realizados por médicos psiquiátricas e/ou neurologistas, fonoaudiólogos e membros de equipes interdisciplinares. Dentre os 28

indivíduos contatados, 10 (36%) desistiram de participar do estudo por motivos diversos.

Deste modo, participaram do estudo 18 indivíduos (GP), 14 (83%) do sexo masculino e 3 (17%) do sexo feminino, idades de 4 a 18 anos (Média= 10,5; Med=11 +/- 5,1). Quanto ao diagnóstico, 10 (56%) apresentaram autismo, 3 (17%) PDD-NOS e 5 (28%) Síndrome de Asperger.

O quadro 1 apresenta a caracterização da casuística quanto a idade (em anos), gênero, diagnóstico, medicação utilizada e procedência.

Tabela 1. Caracterização do grupo pesquisa quanto à idade (em anos), gênero, uso de medicamentos e procedência.

Indivíduos	Idade	Gênero	Diagnóstico	Medicamentos	Procedência
GP-1	10a	F	Autismo	Benzodiazepínicos	APAE – Bauru
GP-2	4a	M	PDD-NOS	Não faz uso	AEE – Bauru
GP-3	5a	M	Autismo	Benzodiazepínicos	FOB – USP
GP-4	10a	M	Autismo	Benzodiazepínicos	APAE – Bauru
GP-5	18a	M	Autismo	Benzodiazepínicos, cloridrato de biperideno, Prometazina	APAE – Marília
GP-6	11a	M	Autismo	Benzodiazepínicos	APAE – Bauru
GP-7	5a	M	PDD-NOS	Benzodiazepínicos	APAE – Bauru
GP-8	18a	F	Autismo	Benzodiazepínicos, Prometazina	APAE – Marília
GP-9	15a	F	Asperger	Não faz uso	Clinica – Bauru
GP-10	8a	M	Asperger	Não faz uso	FOB-USP
GP-11	10a	M	Asperger	Prometazina Acido Valpróico, Clomipramida	Clinica – Marília
GP-12	7a	M	Autismo	Benzodiazepínicos	AEE – Bauru
GP-13	18a	M	Autismo	Cloridrato de Biperideno, Benzodiazepínicos,	APAE-Marília
GP-14	17a	M	Asperger	Não faz uso	AEE – Bauru

GP-15	12a	F	PDD-NOS	Metilfenidato, Acido Valpróico e fluvoxamina	Clínica – Marília
GP-16	15a	M	Autismo	Metilfenidato, Benzodiazepínicos	APAE – Bauru
GP-17	17a	M	Asperger	diprona sódica	APAE – Bauru
GP-18	5a	M	Autismo	Benzodiazepínicos	Espaço Potencial Marília

Foram utilizadas para critérios diagnósticos, além da avaliação clínica, as escalas ATA (Escala de Traços Autísticos) e CARS para homogeneização da amostra. A escala ATA considera como ponto de corte o valor de 15 pontos. Valores iguais ou acima deste foram considerados com TEA, conforme proposto por Assumpção et al. (1999). A população estudada apresentou valor médio de $33 \pm 8,1$ nesta escala. A CARS avalia o comportamento em 14 domínios que geralmente estão afetados no autismo e mais uma categoria geral de impressão do autismo. Os escores de cada domínio variam de 1 (dentro dos padrões de normalidade) a 4 (sintomas graves de autismo). A pontuação varia de 15 a 60 pontos e o ponto de corte para o autismo é 30, sendo que os escores entre 30 a 36 indicam sintomas leves a moderados e acima de 37 graves, conforme proposto por Schopler, Reichler e Renner (1988). Nesta escala, os indivíduos apresentaram valor médio de $36 \pm 8,04$.

Indivíduos que apresentaram sinais clínicos sugestivos de doenças genéticas monogênicas, cromossopatias conhecidas ou doenças multifatoriais, além daqueles com exposição gestacional evidente a acidentes pré ou peri-natais, infecções e outras síndromes foram submetidos a exames complementares diversos. Uma vez confirmada a presença de uma afecção associada ao diagnóstico comportamental, os indivíduos foram excluídos do estudo. Além disso, foram excluídos do estudo indivíduos que faziam uso de melatonina ou de medicamentos que influenciavam a via de síntese e/ou de liberação de melatonina.

Grupo Controle (GC): Participaram deste estudo 18 indivíduos, 14 (78%) do sexo masculino e 4 (22%) do sexo feminino. As idades variaram de 4 a 18 anos (Média=10, Med=10 +/- 4,3).

Não foram incluídos no estudo indivíduos com evidências e/ou queixas de alterações do desenvolvimento motor, cognitivo e de linguagem, histórico de doenças psiquiátricas e neurológicas e como no grupo pesquisa, indivíduos com uso de medicamentos que influenciem a via de síntese ou de liberação de melatonina (SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003; DOYEN et al., 2011).

4.2 Instrumentos

4.2.1 Escala de Distúrbio do Sono em crianças (EDSC)

A Escala de Distúrbios do Sono em Crianças (EDSC) é um instrumento proposto por Bruni et al. (1996) com 26 itens para a avaliação do sono em crianças e adolescentes com idades entre 3 e 18 anos. Neste estudo, foi utilizada a versão brasileira publicada por Ferreira et al. (2009). Cada item é numerado em um escore de 1 (nunca) a 5 (sempre), pela frequência nas últimas 6 semanas. Os escores da escala foram agrupados em seis fatores, segundo a proposta do instrumento, a saber: *Distúrbios do sono de início e manutenção do sono - DIMS* (duração do sono - questão 1, latência do sono - questão 2, ir para a cama sem relutância - questão 3, dificuldade em adormecer - questão 4, adormecer sem ansiedade - questão 5, despertares noturnos - questão 10 e dificuldade em adormecer - questão 11; *Distúrbios respiratórios do sono - DRS* (dificuldades respiratórias - questão 13, apnéia do sono - questão 14 e ronco - questão 15); *Distúrbios*

do despertar - DD (sonambulismo - questão 17, terror noturno - questão 20 e pesadelos - questão 21; *Distúrbios da transição sono-vigília - DTSV* (“hypnic jerks” - abalos - questão 6, distúrbios rítmicos do movimento - questão 7, alucinações hipnagógicas - questão 8, movimentação noturna - questão 12, sonilóquio - questão 18 e bruxismo - questão 19; *Sonolência excessiva diurna - SED* (dificuldade em acordar - questão 22, acordar cansado - questão 23, paralisia do sono - questão 24, sonolência diurna - questão 25 e; *Hiperhidrose do Sono - HS* (adormecer suado - questão 9 e transpirar durante a noite - questão 16). Na somatória dos escores foi seguida a seguinte classificação mínima para os distúrbios:

ESCALA DE DISTÚRBIOS DE SONO PARA CRIANÇAS

Escores

Distúrbios de Início e manutenção do Sono (somar os escores dos itens 1,2,3,4,5,10,11)	Aceitável até 21	
Distúrbios Respiratórios do sono (somar os escores dos itens 13,14,15)	Aceitável até 06	
Distúrbios do Despertar (somar os escores dos itens 17,20,21)	Aceitável até 11	
Distúrbios da Transição Sono-Vigília (somar os escores dos itens 6,7,8,12,18,19)	Aceitável até 23	
Sonolência Excessiva Diurna (somar os escores dos itens 22,23,24,25,26)	Aceitável até 19	
Hiperhidrose do Sono (somar os escores dos itens 9,16)	Aceitável até 07	
Escore Total (somar os 6 escores parciais)		

4.2.2 Caracterização Comportamental

Os perfis comportamentais dos indivíduos com TEA e seus respectivos controles foram obtidos a partir do inventário de comportamento “*Child Behavior Checklist for ages 4-18*” (CBCL/4-18) (ACHENBACH, 1991), sendo utilizada a versão brasileira publicada por Bordin, Paula e Duarte (2001). Este questionário é aplicado por meio de entrevista

direta com o pai ou a mãe para levantar informações a partir de 113 itens relativos a problemas de comportamento no qual o informante classifica o comportamento em: falso ou ausente (escore=0); parcialmente verdadeiro ou às vezes presente (escore=1); e, bastante verdadeiro ou frequentemente presente (escore=2) levando-se em consideração os últimos 6 meses. O somatório dos escores obtidos permite ao avaliador traçar um perfil comportamental da criança ou adolescente, derivado da análise de oito agrupamentos de itens: I – Ansiedade e depressão; II – Retraimento; III – Somático; IV – Social; V – Pensamento; - VI – Atenção; VII – Problemas delinquentes; VIII – Agressividade. A somatória dos três primeiros agrupamentos compreende a *Escala de Internalização* e dos agrupamentos; VII e VIII a *Escala de Externalização*, detectadas e nomeadas desta forma a partir de várias análises multivariadas de problemas emocionais realizadas pelos autores do teste (ACHENBACH, 1991).

Nas escalas, o escore para a categoria não clínica deve ser inferior a 67; para a categoria limítrofe ser de 67 a 70, inclusive; e, para a categoria clínica, ser maior que 70. Em relação às escalas internalizantes e externalizantes, este índice deve ser inferior a 60 para a categoria não clínica; para a categoria limítrofe, ser de 60 a 63, inclusive; e, para a categoria clínica, ser maior que 63. Para pesquisas, o manual sugere três níveis: não clínico, limítrofe e clínico.

4.2.3 Coleta de urina para análise do conteúdo de aMT6s e creatinina

As coletas de urina das crianças foram realizadas pelos pais durante 72 horas contínuas, quer fosse durante a vigília ou despertares espontâneos durante o sono. Os indivíduos e seus pais/responsáveis foram cuidadosamente instruídos para a coleta e

receberam orientações por escrito (Anexo 2). As amostras foram coletadas em recipiente limpo etiquetados com nome, data e hora, sem acréscimo de conservantes ou inibidores de protease e ficaram armazenadas a 4°C.

No laboratório, as amostras tiveram seu volume aferido e foram centrifugadas na velocidade de 3900 rpm (rotações por minuto) por um período de 15 minutos em tubos de 15ml. Em seguida foram produzidas alíquotas de 1ml por período, misturando-se proporcionalmente as urinas coletadas nas várias micções de cada período: 06:00-12:00, 12:00-18:00, 18:00-24:00 e 00:00-06:00. Os microtubos foram armazenados a -20°C até o momento da dosagem de aMT6s e de creatinina (para normalização dos dados).

4.2.4 Coleta de saliva para análise das citocinas

As amostras de salivas foram coletadas pelos responsáveis em 6 horários diferentes do dia (em um único dia), na fase de claro (8:00h e 12:00h e 18h) e na fase de escuro (22:00h e 1:00h e 4:00h). As coletas na fase de escuro foram realizadas com uso de lâmpada vermelha de baixa intensidade. A saliva foi coletada em roletes de algodão armazenados em tubos plásticos específicos para este fim, denominados "Salivette®". Os tubos foram previamente identificados e marcados com cada horário da coleta. Os pais receberam instruções e folheto com orientações para a coleta da saliva (Anexo 3). O material coletado foi mantido a -20°C até o momento das análises.

4.2.5 Análise laboratorial

Para a quantificação do conteúdo de aMT6s foi utilizado o método ELISA (do inglês, *Enzymelinked immunosorbent assay*), utilizando-se *kit* comercial (IBL, Hamburgo, Alemanha). Os resultados foram expressos em ng de aMT6s por mg de creatinina.

As quantificações das citocinas TNF e IL-6 nas amostras de saliva também foram realizadas pelo método ELISA utilizando-se kits comerciais (eBioscience, Inc. San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos em pg/ml.

4.2.6. Avaliação do ritmo biológico de aMT6s

Para identificar ritmicidade de aMT6s, aplicou-se o Cosinor, método de análise de ritmos biológicos que consiste no ajuste da curva cosseno aos dados, o que possibilita descrever as séries temporais de indivíduos por meio de parâmetros rítmicos estimados pelo método dos mínimos quadrados, identificando parâmetros como acrofase e mesor, por exemplo. O método Cosinor também verifica se a série temporal apresenta algum tipo de recorrência periódica, através de um teste de hipóteses (BENEDITO-SILVA, 2003).

4.2.7 Análise dos Resultados

A análise descritiva foi utilizada para demonstrar a dispersão dos dados a partir da Média (M), Mediana (Med), Desvio Padrão (DP), valores Mínimo (Mín.) e Máximo (Máx.). Na comparação entre dois grupos, com variável de natureza contínua, foi aplicado o *Mann-Whitney U test*. Na análise da relação entre as variáveis: aMT6s, distúrbios do sono e citocinas TNF e IL-6 foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Spearman.

O valor de significância adotado foi de 5%. Para verificação de diferenças estatísticas no decorrer da serie temporal da aMT6s, entre os diferentes turnos (diurno e noturno), foi realizada análise de variância – ANOVA (LEWIS, 1995). Os testes estatísticos apropriados para cada análise foram realizados com os softwares estatísticos Prism 5.0 for Windows (Graphpad Software, Inc.) e Statistics 17.0 for Windows.

5. RESULTADOS

Os resultados da EDSC mostram que 44% dos indivíduos do GP apresentam pelo menos um distúrbio do sono. Dentre os seis distúrbios do sono propostos pela escala, os distúrbios respiratórios (44%), hiperhidrose do sono (17%) e distúrbio de início e manutenção do sono (11%) foram os mais referidos por responsáveis pelos indivíduos do GP (Figura 1).

Distúrbios do sono presentes em indivíduos do GP e GC

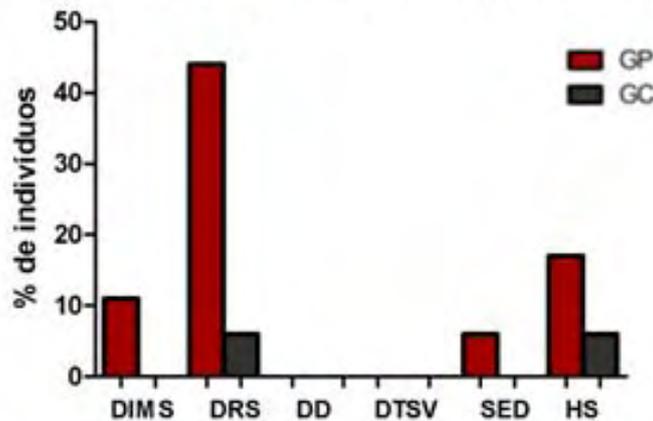


Figura 1. Distribuição (%) dos portadores de distúrbios do sono do grupo pesquisa (GP) (n=18) e controle (GC) (n=18) segundo a escala EDSC. DIMS - Distúrbios de início e manutenção do sono; DRS - Distúrbios respiratórios do sono; DD - Distúrbios do despertar; DTSV - Distúrbios da transição sono-vigília; SED - Sonolência excessiva diurna; HS - Hiperhidrose do Sono.

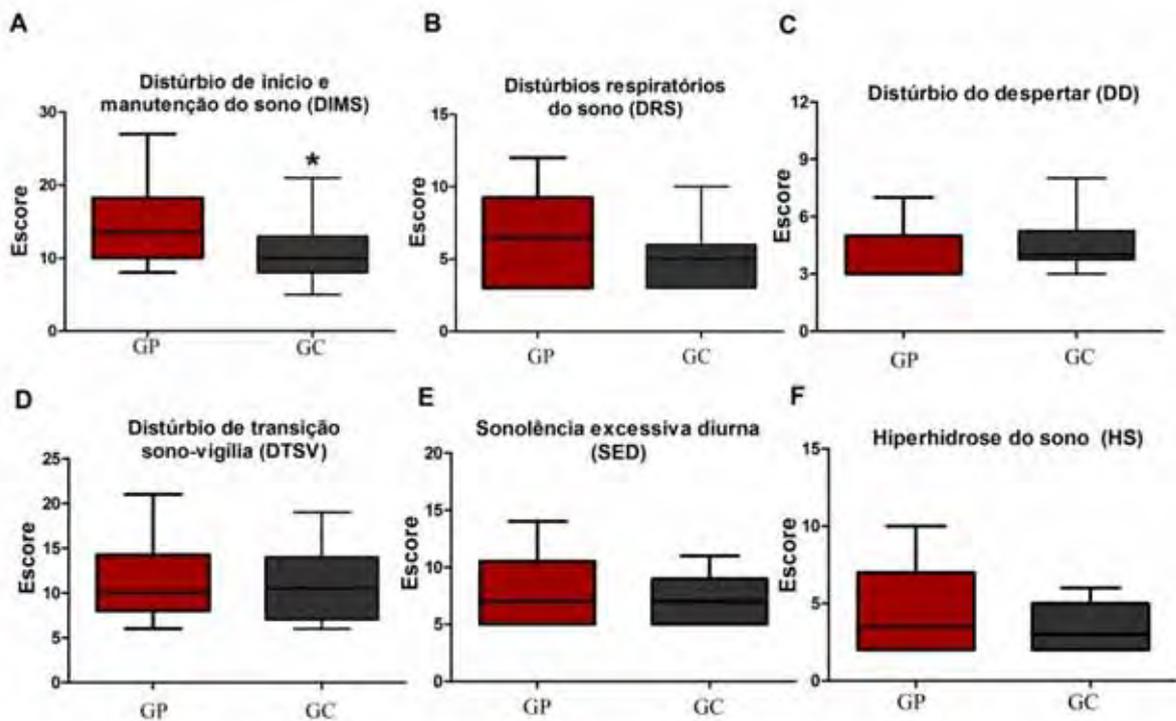
Quanto à classificação que determina o escore mínimo dos distúrbios, tanto o grupo pesquisa quanto o grupo controle apresentaram escores médios dentro dos níveis aceitáveis (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e valor de p dos indivíduos dos grupos: controle (GC) e pesquisa (GP) na Escala de distúrbios do sono para Crianças (EDSC)

Distúrbios		Aceitável até	Média	Mediana	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Valor de p
DIMS	GP	21	14,28	13,50	5,08	8,00	27,00	0,0195*
	GC		10,28	10,00	4,51	0,00	21,00	
DRS	GP	6	5,78	5,50	3,26	3,00	12,00	0,0888
	GC		4,72	4,50	2,44	0,00	7,00	
DD	GP	11	3,83	3,00	1,24	3,00	7,00	0,1590
	GC		4,28	4,00	1,71	0,00	8,00	
DTSV	GP	23	11,28	10,00	4,51	6,00	21,00	0,6558
	GC		10,33	10,50	4,50	0,00	19,00	
SED	GP	19	8,44	7,00	4,30	5,00	21,00	0,6417
	GC		6,94	7,00	2,60	0,00	15,00	
HS	GP	7	4,83	3,50	2,99	2,00	10,00	0,2849
	GC		3,61	3,00	2,25	0,00	10,00	
TOTAL	GP	87	49,44	51,50	14,81	28,00	84,00	0,1634
	GC		40,83	43,00	12,21	0,00	55,00	

Legenda: Distúrbios de início e manutenção do sono - DIMS; Distúrbios respiratórios do sono – DRS; Distúrbios do despertar; Distúrbios da transição sono-vigília – DTSV; Sonolência excessiva diurna – SED; Hiperhidrose do Sono – HS, *p < 0.05.

Na comparação entre os escores de cada distúrbio de sono da EDSC, o GP apresentou maiores valores que o GC no distúrbio de início e manutenção do sono (p=0,0195) (Tabela 2, Figura 2A). Nas demais escalas da EDSC não houve diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 2, Figura 2B-F).



cada classificação de distúrbios do sono da EDSC (A-F) entre os grupos pesquisa (GP) e controle (GC), n=18 (GP) e n=18 (GC); *p < 0.05.

Na comparação entre as medias dos valores encontrados no inventário comportamental (CBCL), quanto às escalas individuais e do total de problemas comportamentais, os maiores escores foram encontrados para o GP com significância para os problemas totais de comportamento (p=0,028), problemas de retraimento (p=0,001), problemas sociais (p=0,049), de pensamento (p=0,0002) e problemas de atenção (p=0,008) (Tabela 3, Figura 3B, D, E, F e K). A média do GP pôde ser classificada na categoria clínica nas escalas: problemas com pensamento, problemas de atenção e problemas internalizantes e na categoria limítrofe na escala: problemas totais de comportamento (Tabela 3). Já o GC apresentou a categoria clínica em problemas internalizantes (Tabela 3). Nas demais classificações de problemas de comportamento não houve diferença estatística entre as médias dos grupos (Tabela 3, Figura 3A, C, G, H,

I e J).

Tabela 3 – Valores de média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e valor de p dos indivíduos dos grupos: controle (GC) e pesquisa (GP) na escala CBCL, *p < 0,05.

Escalas		Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Valor de p
ANSIEDADE	GP	62,94	62,50	6,74	51,00	78,00	0,6608
	GC	61,50	62,00	8,84	51,00	76,00	
RETRAIMENTO	GP	65,89	66,00	8,07	50,00	85,00	0,0012*
	GC	56,72	56,00	5,24	50,00	70,00	
SOMÁTICO	GP	58,56	59,50	7,17	50,00	74,00	0,2790
	GC	60,00	60,50	6,36	50,00	68,00	
SOCIAL	GP	66,00	68,50	7,79	52,00	81,00	0,0490*
	GC	59,22	58,50	8,54	50,00	77,00	
P. PENSAMENTO	GP	75,22	77,00	9,09	57,00	88,00	0,0002*
	GC	55,72	51,50	9,24	50,00	77,00	
P. ATENÇÃO	GP	70,39	69,00	10,56	52,00	90,00	0,0082 *
	GC	55,72	51,00	9,24	50,00	77,00	
P. DELIQUENTES	GP	55,78	52,50	6,63	50,00	72,00	0,5472
	GC	56,06	53,00	7,49	50,00	72,00	
AGRESSIVIDADE	GP	63,61	63,50	10,91	50,00	81,00	0,7351
	GC	63,72	63,50	13,86	50,00	92,00	
INTERNALIZANTES	GP	64,83	65,00	5,83	53,00	76,00	0,8422
	GC	63,39	65,00	8,79	50,00	99,00	
EXTERNALIZANTES	GP	60,78	66,00	10,47	40,00	74,00	0,7960
	GC	60,83	66,00	12,32	34,00	77,00	
PROBLEMAS TOTAIS	GP	68,72	71,00	68,72	57,00	77,00	0,0288*
	GC	59,11	59,00	11,32	38,00	78,00	

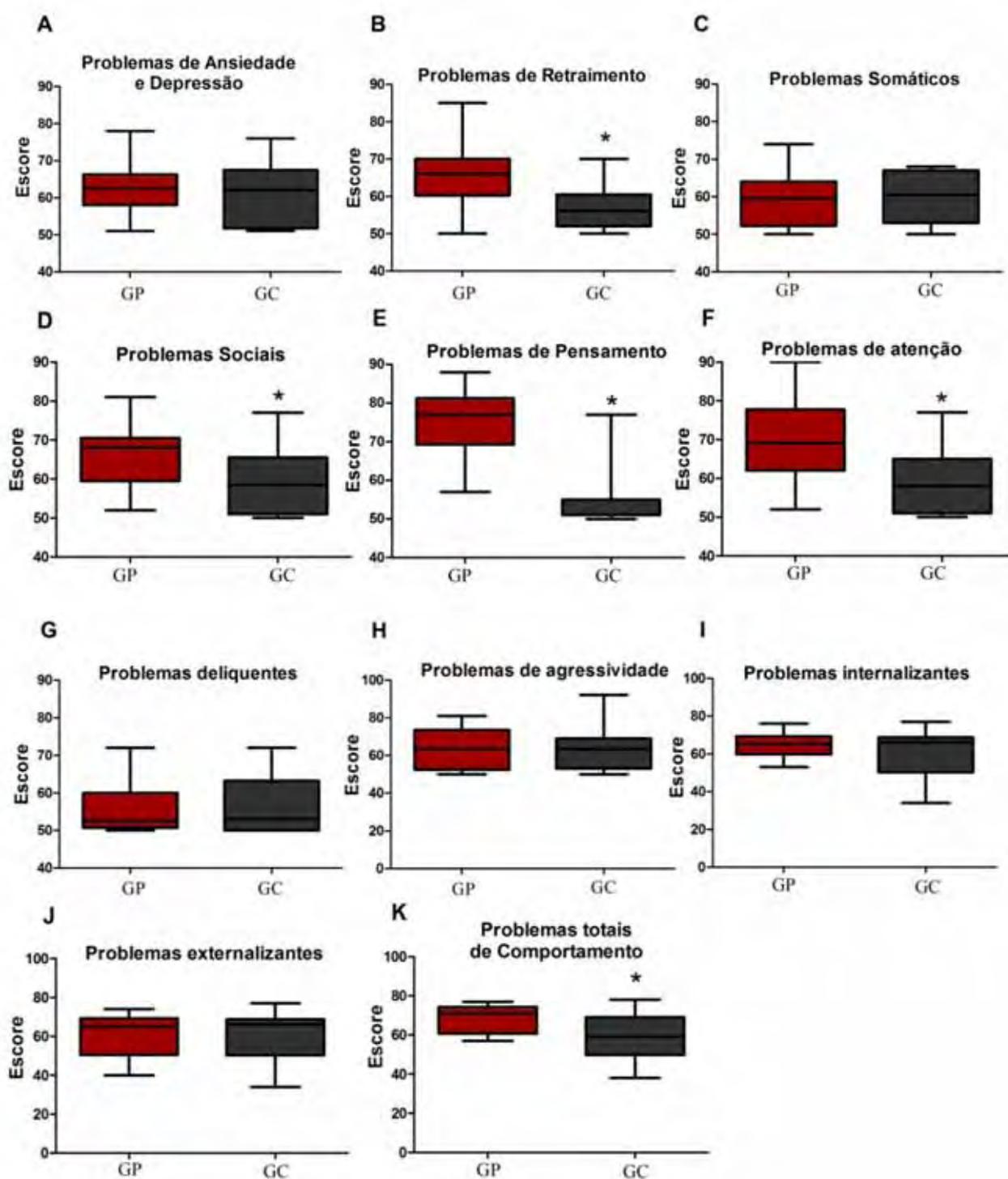


Figura 3. Análise comparativa entre a média \pm EPM dos escores dos escores de cada escala do comportamento encontrados no inventário comportamental CBCL (A-F) entre o grupo pesquisa (GP) e controle (GC), $n=18$ (GP) e $n=18$ (GC), $*p < 0.05$.

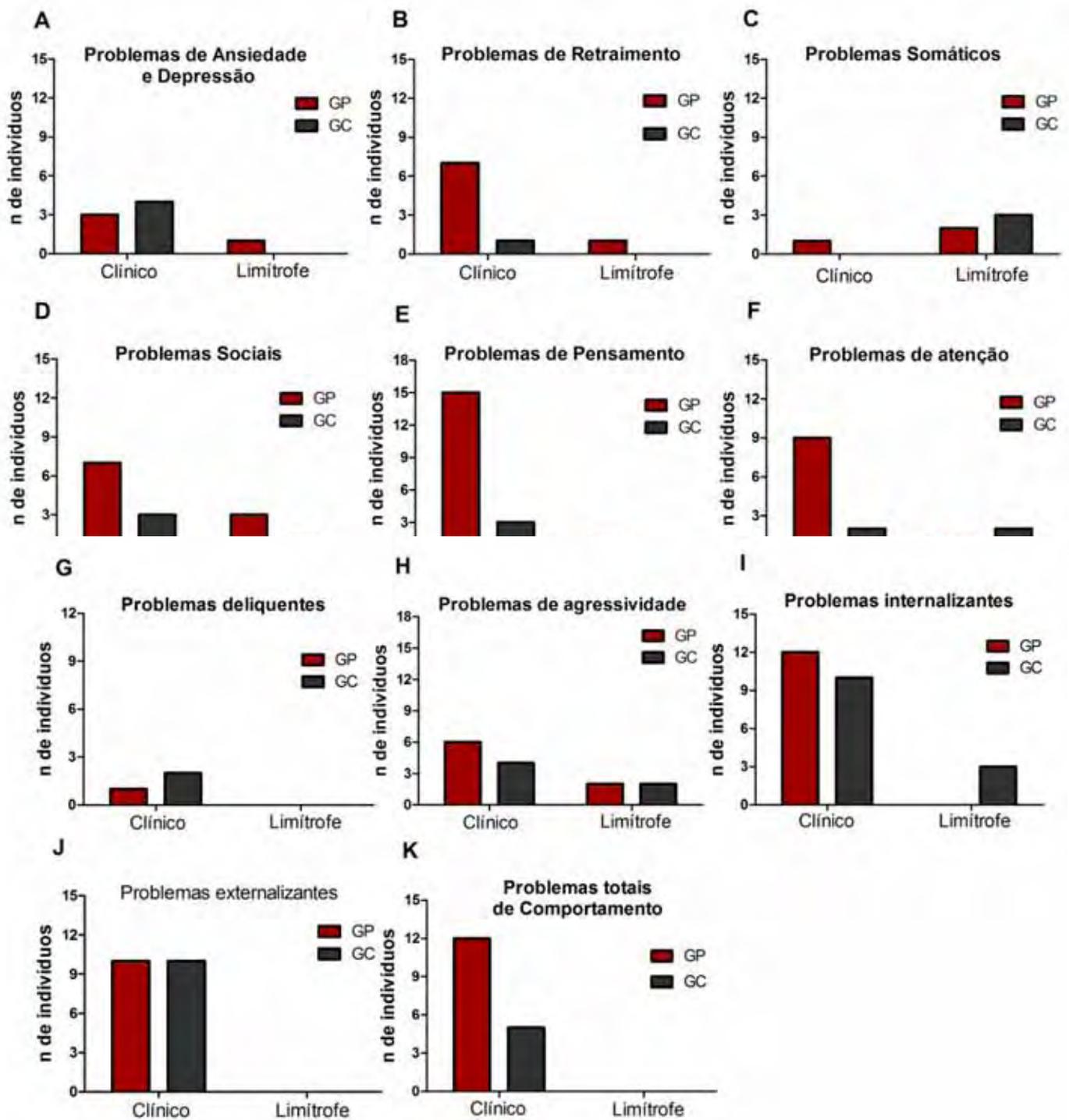
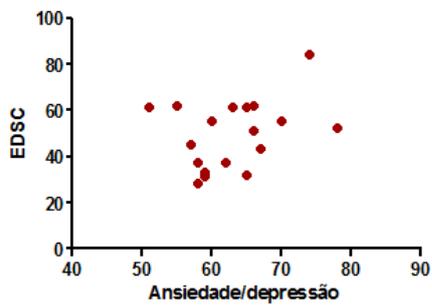


Figura 4. Número de indivíduos do GP e GC caracterizados como clínicos ou limítrofes nos problemas comportamentais nas escalas do CBCL nos grupos pesquisa (GP) e controle (GC), n=18 para cada grupo.

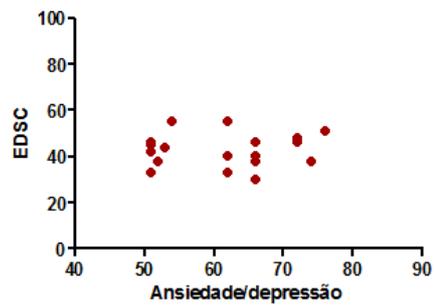
Os problemas de retraimento, problemas sociais, problemas de pensamento, problemas de atenção, problemas de agressividade, problemas internalizantes e problemas totais do comportamento foram clinicamente mais frequentes no GP (Figura 4B,C,D,E,F,H,I,K). No GC foram encontrados problemas de ansiedade e depressão, estes dois sendo inclusive mais frequentes que no GP. Além disso, os problemas internalizantes e externalizantes estiveram presentes em número expressivo no GC (Figura 4A, I, J).

Na análise da correlação entre os distúrbios do sono da EDSC e o inventário comportamental CBCL, verificou-se que os distúrbios do sono influenciaram negativamente nos problemas do pensamento ($p=0,002$), internalizantes ($p= 0,013$) e totais do comportamento ($p=0,032$) de indivíduos do GP (Figura 5G, O, S). Nos demais problemas de comportamento não houve correlação entre as variáveis (Figura 5A, C, E, I, K, M, Q). No grupo controle os escores totais do EDSC não influenciaram nos problemas do comportamento (Figura 5B, D, F, H, J, L, N, P, R, T).

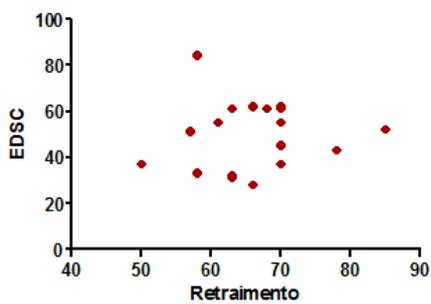
A Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas de Ansiedade/depressão em indivíduos do GP



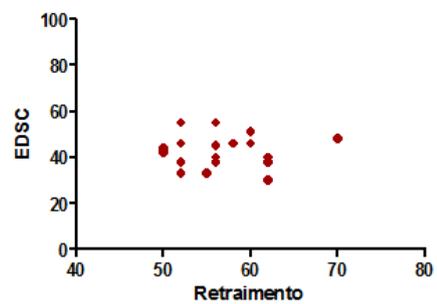
B Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas de Ansiedade/depressão em indivíduos do GC



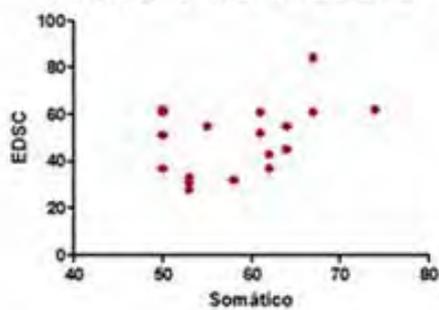
C Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas de Retraimento em indivíduos do GP



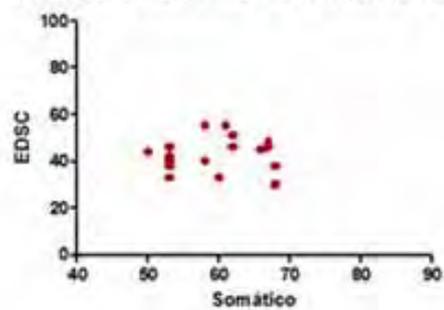
D Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas de Retraimento em indivíduos do GC



E Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas Somáticos em indivíduos do GP

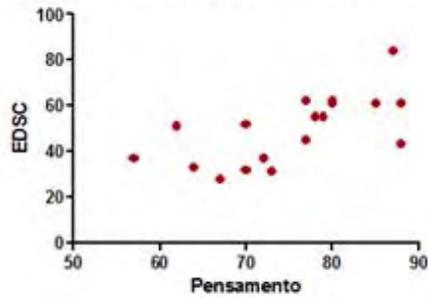


F Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas Somáticos em indivíduos do GC



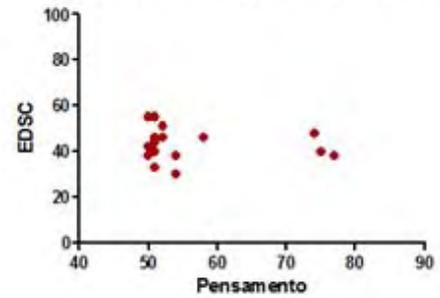
G

Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas do Pensamento em indivíduos do GP



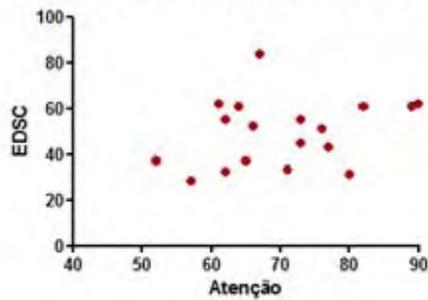
H

Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas de Pensamento em indivíduos do GC



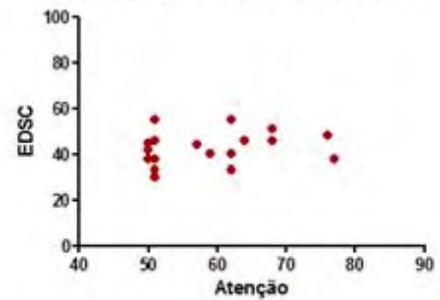
I

Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas de Atenção em indivíduos do GP



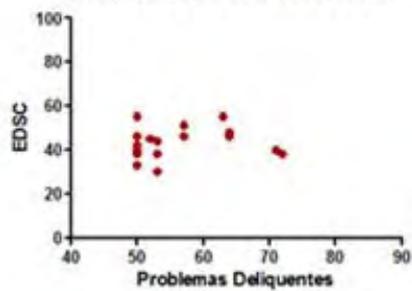
J

Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas de atenção em indivíduos do GC



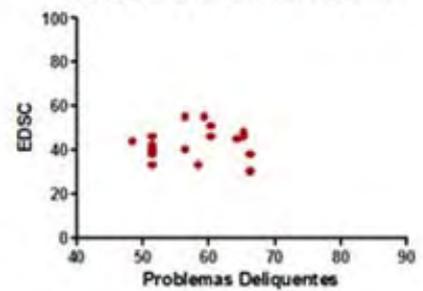
K

Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas delinquentes em indivíduos do GP



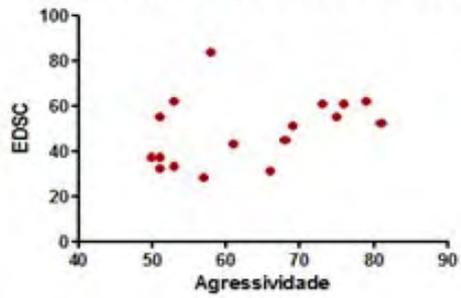
L

Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas delinquentes em indivíduos do GC



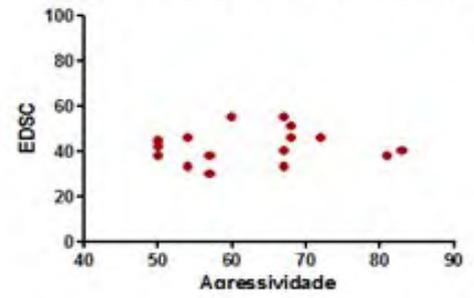
M

Correlação entre os escores totais do EDSC e Agressividade em indivíduos do GP



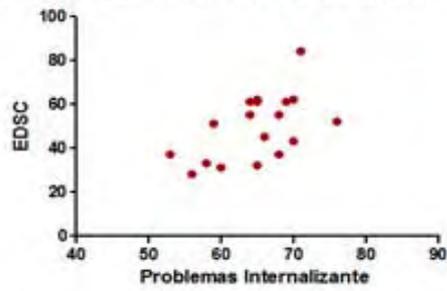
N

Correlação entre os escores totais do EDSC e Agressividade em indivíduos do GC



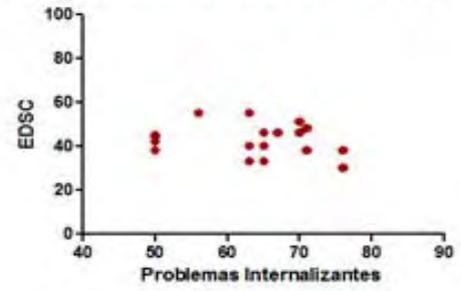
O

Correlação entre os escores totais do EDSC e problemas internalizantes em indivíduos do GP



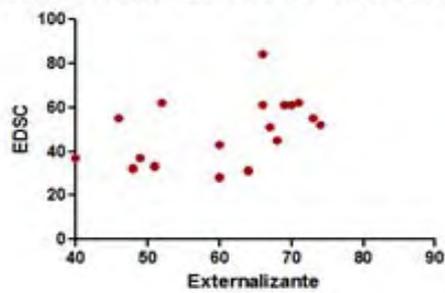
P

Correlação entre os escores totais do EDSC e problemas internalizantes em indivíduos do GC



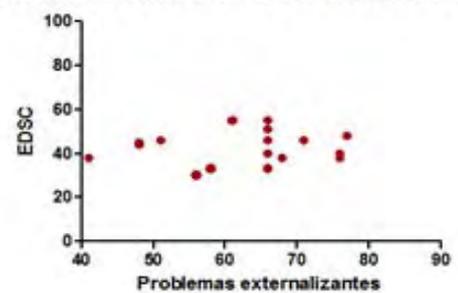
Q

Correlação entre os escores totais do EDSC e problemas externalizantes em indivíduos do GP



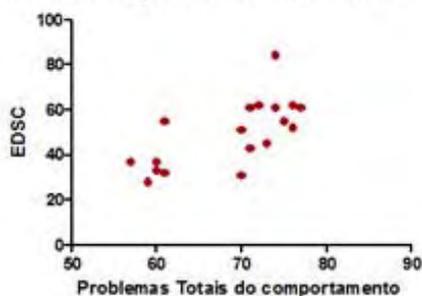
R

Correlação entre os escores totais do EDSC e problemas externalizantes em indivíduos do GC



S

Correlação entre os escores totais do EDSC e problemas Totais do comportamento em indivíduos do GP

**T**

Correlação entre os escores totais do EDSC e problemas Totais do comportamento em indivíduos do GC

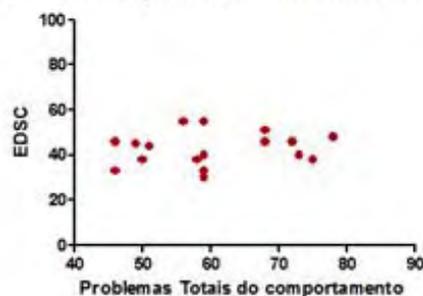


Figura 5. Correlação entre os escores totais do EDSC e os problemas do comportamento no grupo pesquisa (GP) (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S) e no grupo controle (GC) (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T). EDSC x problemas de ansiedade e depressão GP ($p=0,1858$, $r=0,3267$), EDSC x problemas de ansiedade e depressão GC ($p=0,06325$, $r=0,1844$), EDSC x problemas de retraimento GP ($p=0,7994$, $r=0,06448$), EDSC x problemas de retraimento GC ($p=0,8998$, $r=0,032$), EDSC x problemas somáticos GP ($p=0,1609$, $r=0,3450$), EDSC x problemas somáticos GC ($p=0,9207$, $r=-0,02526$), EDSC x problemas de pensamento GP ($p=0,032$, $r=0,6549$), EDSC x problemas de pensamento GC ($p=0,3245$, $r=0,5342$), EDSC x problemas de atenção GP ($p=0,273$, $r=0,2706$), EDSC x problemas de atenção GC ($p=0,2333$, $r=0,2674$), EDSC x problemas delinquentes GP ($p=0,7606$, $r=0,5823$), EDSC x problemas delinquentes GC ($p=0,3435$, $r=0,2371$), EDSC x problemas de agressividade GP ($p=0,5213$, $r=0,2234$), EDSC x problemas de agressividade GC ($p=0,1426$, $r=0,3598$), EDSC x problemas internalizantes GP ($p=0,013$, $r=0,6581$), EDSC x problemas internalizantes GC ($p=0,089$, $r=0,3115$), EDSC x problemas externalizante GP ($p=0,2562$, $r=0,2824$), EDSC x problemas externalizantes GP ($p=0,2712$, $r=0,2740$), EDSC x problemas totais do comportamento GP ($p=0,2712$, $r=0,2740$), EDSC x problemas totais do comportamento GC ($p=0,052$), * $p < 0,05$.

Na comparação entre o conteúdo de aMT6s houve diferença estatística entre os grupos GP e GC durante o período noturno ($p=0,007$) (Figura 6A). Na análise do conteúdo de aMT6s acumulada em 24h, os indivíduos do GP apresentaram valores estatisticamente maiores ($p= 0,0272$) quando comparadas a indivíduos do GC (Figura 6B).

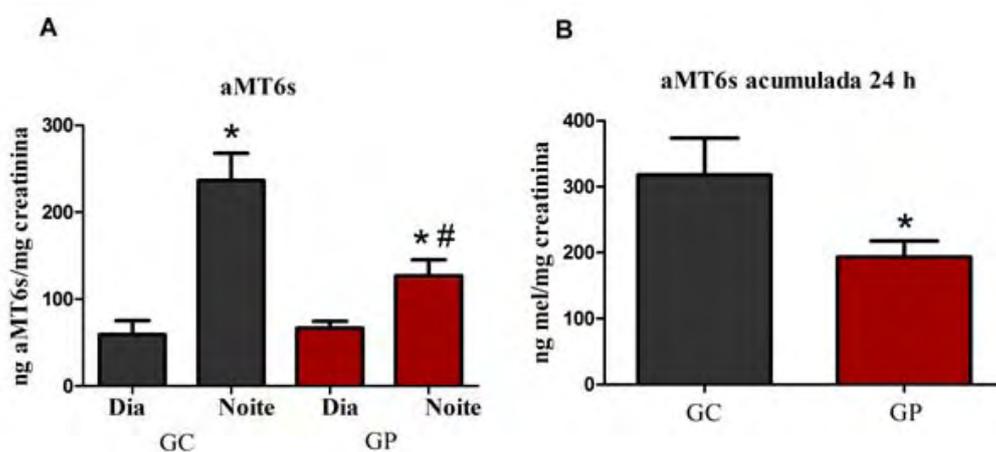


Figura 6. Em A, análise comparativa entre a média \pm EPM do conteúdo de aMT6s diurno e noturno observados no grupo pesquisa (GP) e do grupo controle (GC). Em B, Análise comparativa entre a média \pm EPM do conteúdo de aMT6s acumulado em 24h observado no grupo pesquisa (GP) e do grupo controle (GC). Em A, * $p < 0.05$ dia \neq noite; # $p < 0.05$ noite (GC) \neq noite (GP). Em B, * $p < 0.05$ dia \neq noite.

Não foi encontrado diferença estatística entre o conteúdo de aMT6s entre o GP e o GC quando comparado os dois grupos em cada intervalo de 6 horas, nota-se apenas uma tendência de menores conteúdos no GP no período de 24:00h a 06:00h. O maior pico de conteúdo de aMT6s em ambos os grupos também foi verificado neste período.

Conteúdo de aMT6s por período nos indivíduos do GP e GC

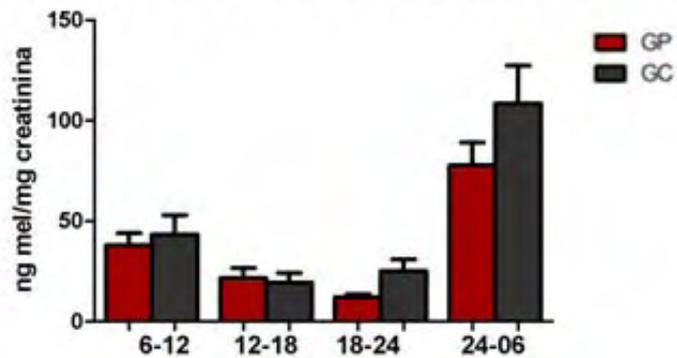


Figura 7. Conteúdo de aMT6s (ng aMT6s / mg de creatinina) em intervalos de 6h (6:00h-12:00h, 12:00-18:00, 18:00-24:00, 24:00-06:00 h) em GP (n=18) e do GC (n=18).

Na tabela 4 estão expressos os valores encontrados no Cosinor dos 18 indivíduos do GP, sendo que destes 49% apresentaram ritmicidade circadiana normal no conteúdo de aMT6s; 40% dos indivíduos do GP não apresentaram variação rítmica e 11% apresentaram ritmo invertido com o conteúdo de aMT6s à noite menor que o conteúdo durante o dia. No GC, 100 % dos indivíduos apresentaram ritmo normal (Figura 8).

Tabela 4. Parâmetros obtidos por meio do COSINOR para o conteúdo de aMT6s utilizando-se 72 horas de coleta.

	Período	Mesor	Amplitude	Acrofase	% ve TOTAL	Valor de p
Indivíduos						
GP1	1440	22,750	24,380	525,890	644,193	0,102
GP2	1440	45,417	47,325	264,208	45,239	0,317
GP3	1440	158,250	186,292	218,523	86,340	0,000*
GP4	1440	37,000	49,356	213,396	75,637	0,017*
GP5	1440	19,917	3,670	1417,890	59,964	0,895
GP6	1440	115,167	102,739	564,211	99,799	4,187
GP7	1440	105,185	139,391	304,471	88,302	0,002*
GP8	1440	27,833	31,203	256,063	91,957	0,001*
GP9	1440	33,667	41,446	135,483	91,686	0,000*
GP10	1440	84,000	90,282	223,441	80,939	0,015*
GP11	1440	20,250	22,914	274,327	88,507	0,000*
GP12	1440	56,630	56,152	357,862	72,602	0,096
GP13	1440	23,333	14,269	236,794	95,317	0,000*
GP14	1440	7,666	5,270	253,740	90,269	0,010*
GP15	1440	31,667	30,108	322,151	92,154	0,001*
GP16	1440	22,705	30,572	294,127	93,815	0,000*
GP17	1440	31,917	37,750	686,974	53,833	0,268
GP18	1440	16,200	23,643	191,643	72,682	0,063

*p<0,0005;

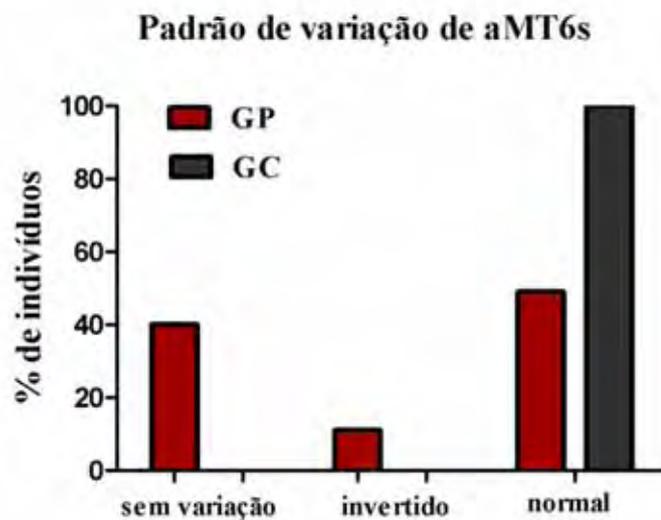


Figura 8. Distribuição (%) do padrão de variação circadiana do conteúdo de aMT6s nos indivíduos do GP (n=18) e do GC (n=18). Sendo: sem variação, invertido (pico durante o dia) e normal (pico durante a noite).

A análise dos valores de TNF durante o período noturno, o grupo GP apresentou conteúdo de TNF maior que o GC ($p=0,035$) (Figura 8). Não houve diferença estatística na variação de ritmo (dia/noite) nos indivíduos do GP e GC.

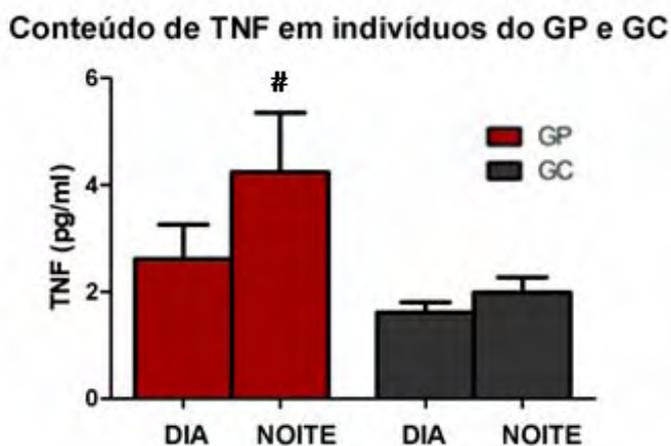


Figura 8. Análise comparativa entre as médias \pm EPM do conteúdo salivar de TNF (pg/ml) do grupo pesquisa (GP) e do grupo controle (GC) dia e noite. # $p < 0.05$, GP noite \neq GC noite. $n=18$.

A análise dos valores de IL-6 não mostrou diferença estatística entre os conteúdos dia e noite e também na comparação entre os indivíduos do GP e GC (Figura 9).

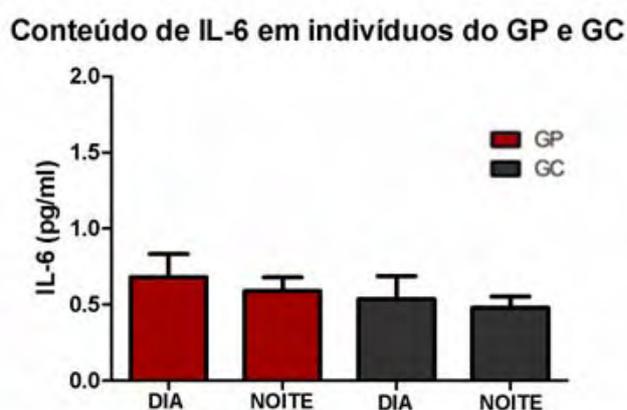
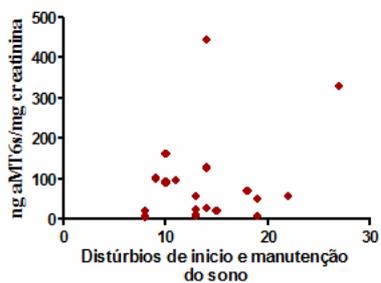


Figura 9. Análise comparativa entre as médias \pm EPM do conteúdo salivar de IL-6 (pg/ml) do grupo pesquisa (GP) e do grupo controle (GC) dia e noite. $n=18$.

Na análise de correlação entre aMT6s e os distúrbios do sono, houve influência para os distúrbios respiratórios do sono ($p=0,013$) nos indivíduos do GP (Figura 10C), nos demais distúrbios o conteúdo de aMT6s não apresentou correlação com os distúrbios de sono (Figura 10 A, B, D-N).

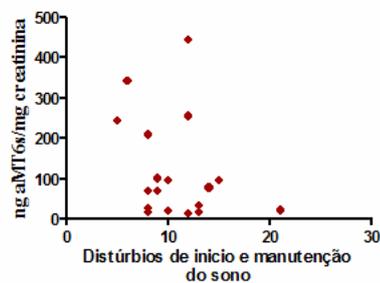
A

Correlação entre aMT6s e Distúrbios de início e manutenção do sono em indivíduos do GP



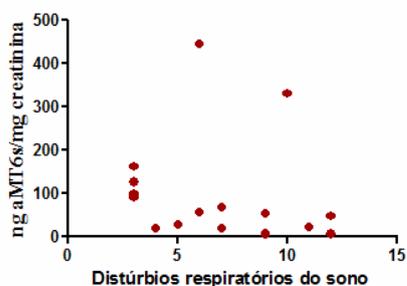
B

Correlação entre aMT6s e Distúrbios de início e manutenção do sono em indivíduos do GC



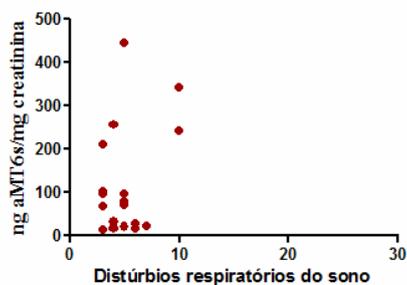
C

Correlação entre aMT6s e Distúrbios Respiratórios do sono em indivíduos do GP



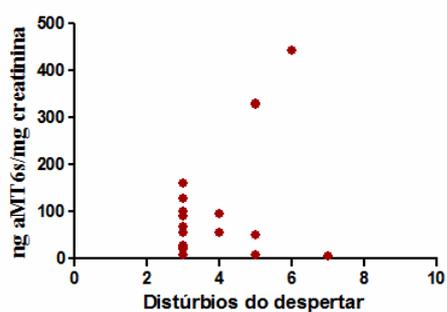
D

Correlação entre aMT6s e Distúrbios Respiratórios do sono em indivíduos do GC



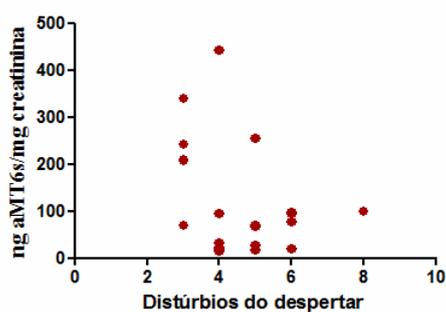
E

Correlação entre aMT6s e Distúrbios do despertar em indivíduos do GP

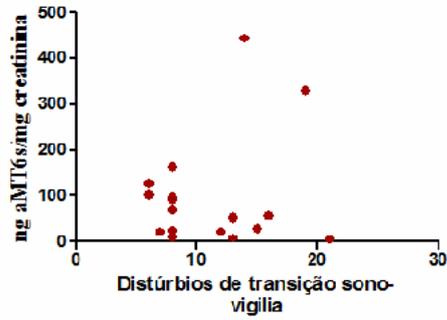


F

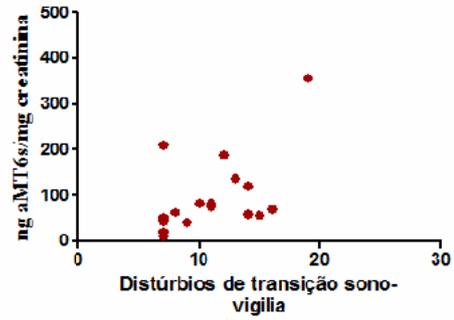
Correlação entre aMT6s e Distúrbios do despertar em indivíduos do GC



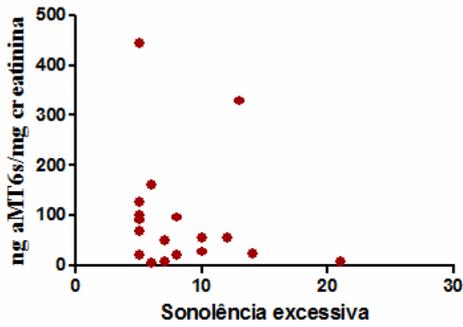
G Correlação entre aMT6s e Distúrbios Distúrbios de transição sono-vigília em indivíduos do GP



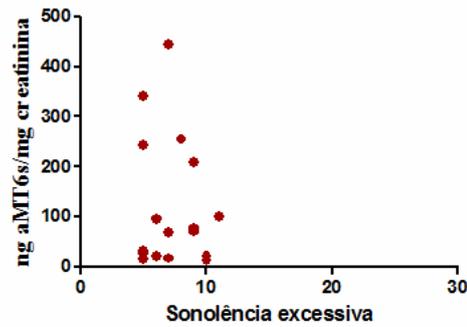
H Correlação entre aMT6s e Distúrbios Distúrbios de transição sono-vigília em indivíduos do GC



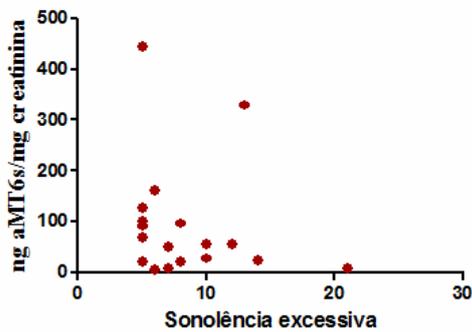
I Correlação entre aMT6s e Sonolência excessiva em indivíduos do GP



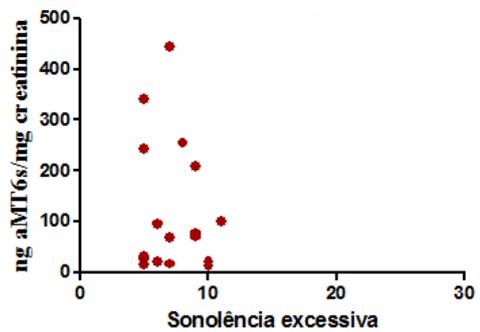
J Correlação entre aMT6s e Sonolência excessiva em indivíduos do GC



K Correlação entre aMT6s e Sonolência excessiva em indivíduos do GP



L Correlação entre aMT6s e Sonolência excessiva em indivíduos do GC



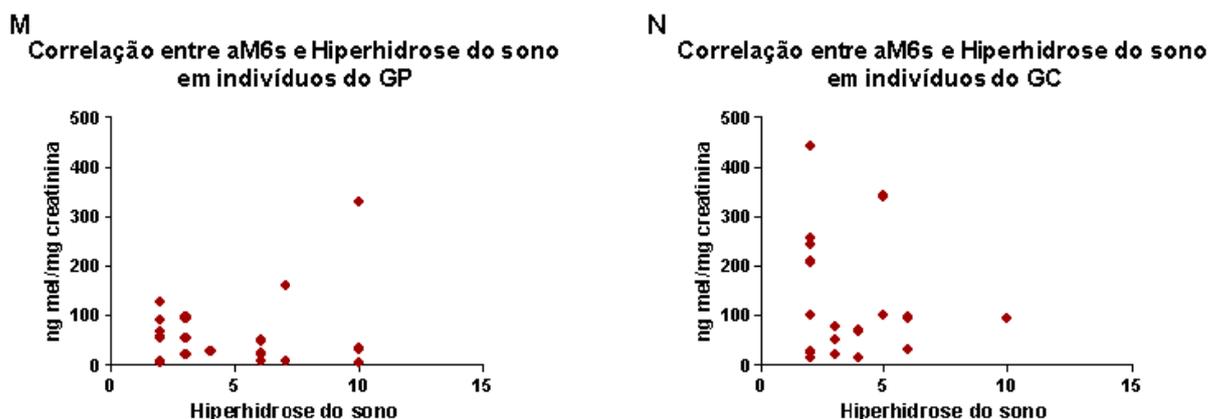


Figura 10. Correlação entre aMT6s e os distúrbios do sono no GP (10A, C, E, G, I, K, M) e GC (B, D, F, H, J, L, N), aMT6s x distúrbio de início e manutenção do sono no GP ($p=0,208$), aMT6s x distúrbio de início e manutenção do sono no GC ($p=0,7208$, $r=-0,09058$), aMT6s x distúrbio respiratório do sono no GP ($p=0,013$, $r=-0,3046$), aMT6s x distúrbio respiratório do sono no GC ($p=0,0233$, $r=-0,5313$), aMT6s x distúrbio do despertar no GP ($p=0,7984$, $r=-0,06478$), aMT6s x distúrbio do despertar no GC ($p=0,9158$, $r=-0,7846$), aMT6s x distúrbio de transição sono vigília no GP ($p=0,9934$, $r=-0,0028$), aMT6s x distúrbio de transição sono vigília no GC ($p=0,1321$, $r=-0,5438$), aMT6s x sonolência Excessiva no GP ($p=0,9901$, $r=0,0031$), aMT6s x sonolência Excessiva no GP ($p=0,1558$, $r=0,4327$), aMT6s x hiperhidrose do sono no GP ($p=0,0542$, $r=0,7542$), aMT6s x hiperhidrose do sono no GP ($p=0,5678$, $r=-0,1443$)
 $n=18$

Na correlação entre aMT6s e TNF, não houve diferença estatística entre as variáveis (Figura 11).

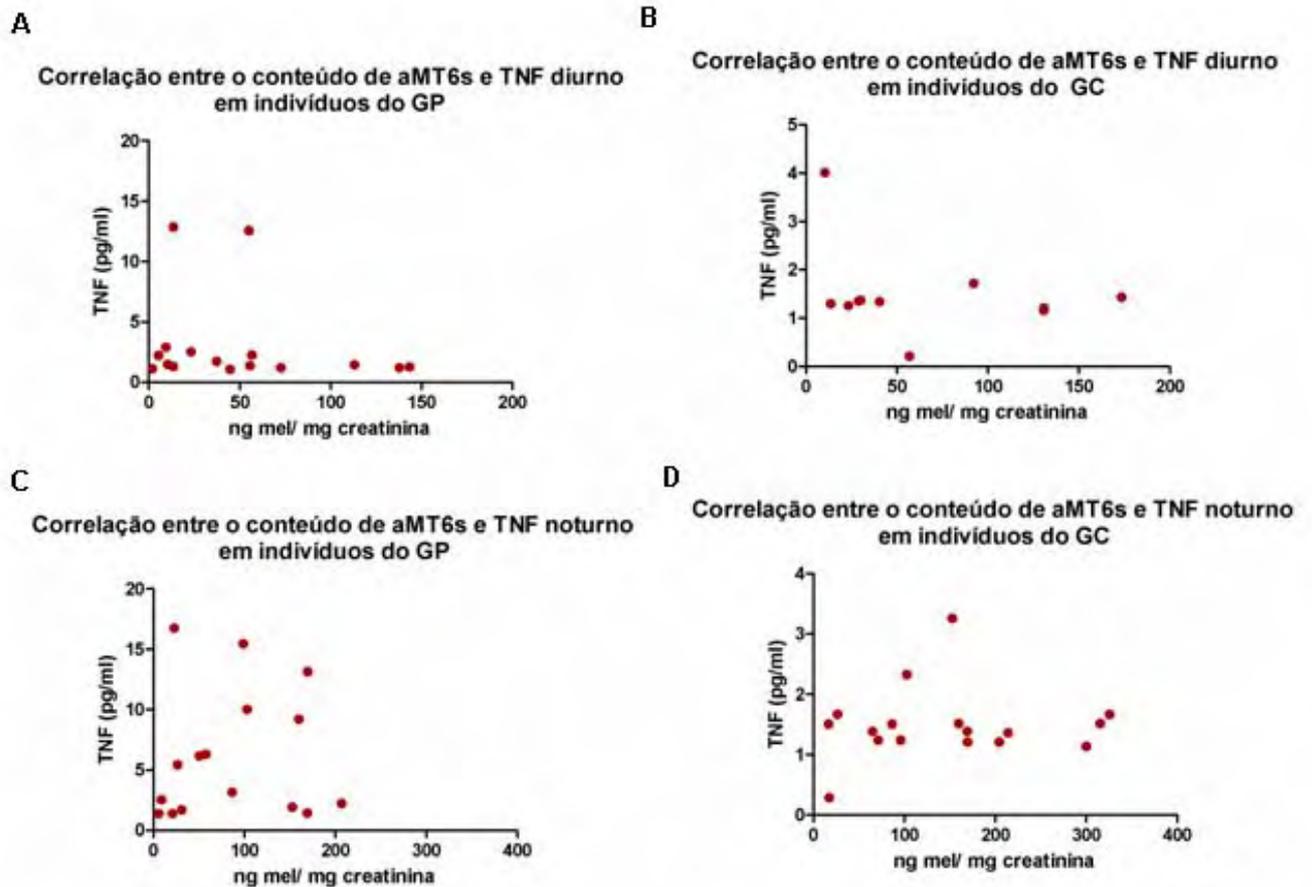


Figura 11. Correlação entre aMT6s e TNF no grupo pesquisa (GP), em (A) aMT6s e TNF diurnos, em (C) aMT6s e TNF noturnos e grupo controle (GC) em (B) aMT6s e TNF diurnos, em (D) aMT6s e TNF noturnos. aMT6s x TNF diurno no GP ($p=0,1772$, $r=-0,3328$), aMT6s x TNF diurno no GC ($p=0,1119$, $r=-0,3998$), aMT6s x TNF noturno no GP ($p=0,5420$, $r=0,1539$), aMT6s x TNF diurno no GC ($p=0,9738$, $r=0,0086$), $n=18$.

Na análise da correlação entre aMT6s e IL-6, não houve correlação entre as variáveis (Figura 12).

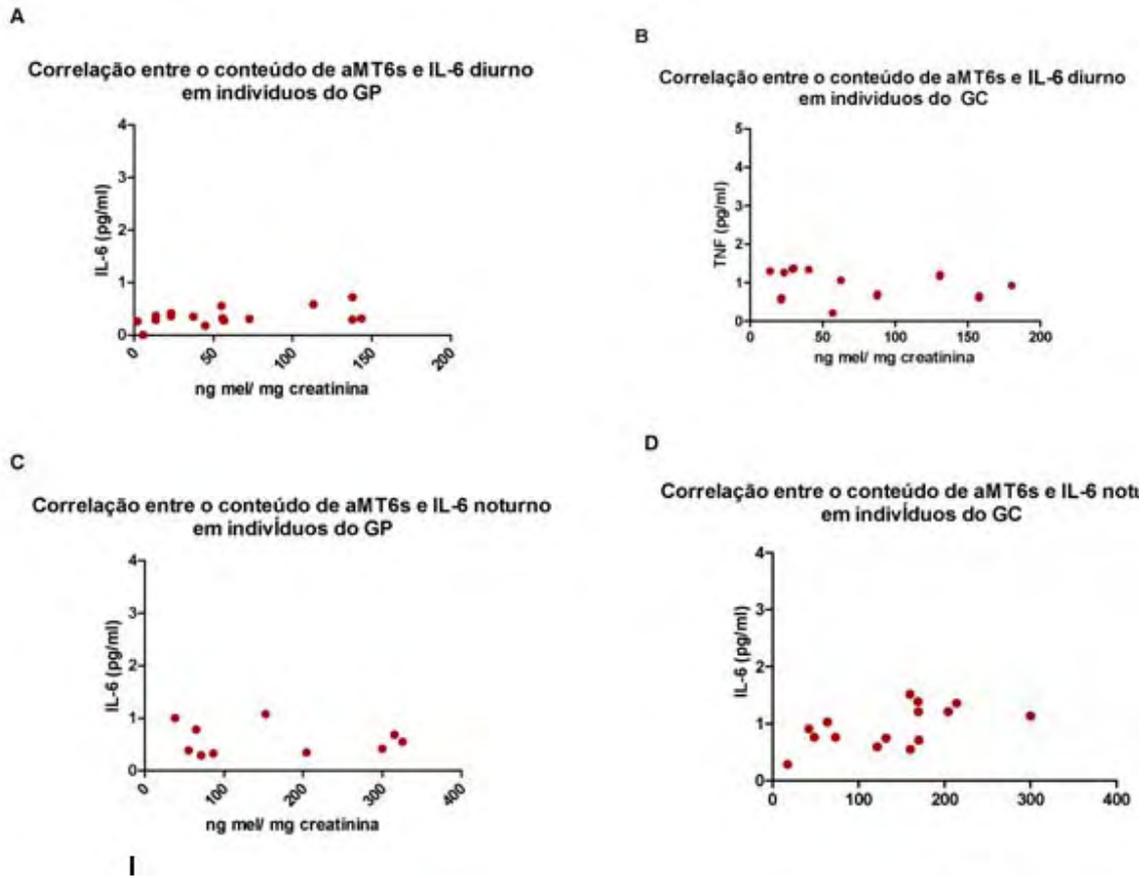


Figura 12. Correlação entre aMT6s e IL-6 no GP (11A,C) e GC (B,D). aMT6s x IL-6 diurno no GP ($p=0,4327$, $r= 0,1259$), aMT6s x IL-6 diurno no GC ($p=0,1232$, $r=0,2141$), aMT6s x IL-6 noturno no GP ($p=0,0565$, $r=0,2141$), aMT6s x IL-6 diurno no GC ($p=0,1738$, $r=0,3219$), $n=18$.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo são discutidos: A caracterização dos distúrbios do sono e a influência destes no comportamento; os níveis de melatonina por meio da quantificação de aMT6s e os níveis das citocinas TNF e IL-6. A relação entre os conteúdos de aMT6s, TNF, IL-6 e os distúrbios do sono em indivíduos com TEA e em indivíduos controles.

6. 1 Caracterização dos distúrbios do sono e a influência destes no comportamento de indivíduos com TEA (GP) e controle (GC)

Nossos resultados mostraram que 44% do GP apresentou pelo menos um distúrbio do sono, o que corrobora com a prevalência relatada na literatura internacional que estima 44 a 83% de presença de distúrbios de sono em indivíduos com TEA (COTTON, RICHDALE, 2006; GIANNOTTI et al., 2006).

Dentre os seis distúrbios do sono propostos pela escala EDSC, as dificuldades relacionadas com os distúrbios respiratórios, hiperhidrose do sono e de manutenção do sono foram as mais referidas nos indivíduos com TEA, sendo frequentes as queixas de roncos, transpiração noturna, maior frequência e longos períodos de acordares noturno o que também está em concordância com dados da literatura (WILLIAMS, SEARS, ALLARD, 2004; COTTON, RICHDALE, 2006; GIANNOTTI et al., 2006; TAYLOR, SCHRECK, MULICK, 2012).

Dentre os valores da escala de distúrbios de sono, apenas os distúrbios de manutenção e início do sono apresentaram diferença estatística na comparação entre os grupos com maior prevalência no GP. Ainda que as estatísticas descritivas mostrem uma tendência à diferenças entre o GP e o GC nos outros distúrbios, estes não apresentaram

significância. Tal fato pode dever-se ao perfil do grupo de indivíduos com TEA que apresentou padrões variados de sono e comportamento. A ampliação da amostra poderia influenciar e alterar os valores de significância dos testes estatísticos resultando em um número maior de distúrbios descritos para esta população (MOURÃO, 2009).

Ao analisar o percentual de distúrbios de sono no grupo com TEA, devemos considerar que a escala questionário sobre sono-vigília utilizada é uma fonte de dados subjetiva preenchida pelos pais. Entre os inconvenientes deste tipo de instrumento, está o fato de que a percepção dos pais de indivíduos com TEA em relação aos problemas de sono dos seus filhos pode nem sempre refletir os reais problemas de sono que os indivíduos manifestam (HERING et al., 1999). Eles poderiam assim subestimar, desvalorizar, ou desconhecer os hábitos de sono dos seus filhos.

Outro fator que devemos considerar é a utilização de medicamentos pela maioria da população com TEA. Na nossa amostra, a maioria dos indivíduos do GP (77%) relatou usar medicamentos que podem ocasionar reações adversas que interferem no sono. O tratamento medicamentoso das crises comportamentais, da ansiedade, entre outros, são contidos com a ajuda de medicamentos que podem conter efeitos colaterais como sedação, sonolência ou insônia (ROTTA, 2002; LEITE; PRADO, 2004). Ao induzir farmacologicamente o sono sabemos que nem sempre estes medicamentos propiciam qualidade e conseqüente melhora nas atividades de vigília, mas eles são capazes de mascarar o diagnóstico e a prevalência dos distúrbios do sono (RICHDALE, 1999; WIGGS, STORES, 2004).

Quanto à influência que os distúrbios do sono encontrados possam ter no comportamento, em uma primeira etapa deste estudo foi realizada a caracterização do

perfil comportamental no qual indivíduos do GP foram identificados por seus responsáveis como tendo problemas comportamentais do tipo de pensamento e de atenção semelhantes aos encontrados na literatura (KOBAYASHI, MURATA, 1998; BÖLTE, DICKHUT, POUSTKA, 1999; PERISSINOTO et al., 2011). Quando comparados a indivíduos controles, estes tiveram diferenças significativas para os problemas sociais e de retraimento que vão ao encontro com as características que o DSM IVTR (APA, 2002) e a CID 10 (OMS, 1993) colocam para o TEA.

Posteriormente, no presente estudo, foi verificado por meio de testes de correlação que os distúrbios do sono presentes nos indivíduos do GP tiveram efeito negativo para os problemas comportamentais do tipo pensamento, internalizantes e problemas totais do comportamento. Há relatos de que os problemas de sono podem realmente agravar algumas das características intrínsecas ao diagnóstico de TEA, principalmente no que se refere à cognição e ao comportamento (ELIA et al., 2000; TAYLOR, SCHRECK, MULICK, 2012; SCHWICHTENBERG et al., 2013). Por outro lado, no grupo controle, os distúrbios do sono presentes não influenciaram nos problemas comportamentais, o que pode ser devido ao baixo percentual (6%) de distúrbios de sono nesta população.

A ocorrência de correlação entre distúrbios do sono e o comportamento nos indivíduos com TEA encontrada em nosso estudo, não determina causalidade, mas há indícios de que a melhora da qualidade do sono influencia positivamente no quadro comportamental (VRIEND et al., 2011). Novos estudos que investiguem indivíduos com TEA, e avaliem o comportamento, antes e depois do tratamento para melhoria do padrão de sono, ainda são necessários para esclarecer esta correlação.

6.2 Quantificação do conteúdo de aMT6s e citocinas (TNF e IL-6) nos indivíduos com TEA (GP) e controle (GC).

Nossos resultados mostraram que os conteúdos noturno de aMT6s foram estatisticamente menores em indivíduos do GP, quando comparados ao GC. O baixo conteúdo de aMT6s em crianças e adolescentes com TEA já foi relatado em estudos anteriores (TORDJMAN et al., 2005; TORDJMAN et al., 2012) e contrasta com estudo que relatou conteúdo elevado em adultos com TEA durante o período diurno e conteúdo noturno semelhante ao controle (RITVO et al., 1993), tal diferença pode estar relacionada a diferenças de faixa etária na população e no protocolo entre os estudos.

Quando o conteúdo de melatonina é analisado diretamente por meio dos níveis sanguíneos em indivíduos com TEA nota-se a redução do conteúdo de melatonina noturna quando comparado ao controle (KULMAN et al., 2000; NIR et al., 1995), assim como a ausência do aumento fisiológico do conteúdo noturno de melatonina (KULMAN et al., 2000). Isso demonstra que tanto pela quantificação direta de melatonina no sangue quanto de forma indireta por quantificação de aMT6s urinária os resultados são conclusivos para uma menor produção de melatonina noturna em um grande percentual de indivíduos com TEA (ARENDDT et al., 1985; MARKEY et al., 1985).

Em nosso estudo além de analisar os conteúdos diurno e noturno e compará-los com indivíduos controles, foi analisada também a existência de ritmicidade circadiana no conteúdo de aMT6s, por meio de teste estatístico para este fim, e ficou demonstrado que 60% dos indivíduos do GP apresentaram ritmicidade do conteúdo de aMT6s, sendo que, destes, 11% apresentaram conteúdo maior durante o dia do que a noite, ou seja apresentam um ritmo invertido de aMT6s. Neste caso, é preciso salientar que, estes

indivíduos não apresentam uma grande produção de melatonina durante o dia, mas sim que o conteúdo dos períodos noturnos de aMT6s nestes indivíduos com TEA foi tão pequeno que acabou por ressaltar a diferença com o conteúdo dos períodos diurnos que por sua vez não diferiram do controle. No GC 100% dos indivíduos apresentaram ritmicidade normal com conteúdo de aMT6s maior durante a noite. A hipótese da ausência de um ritmo circadiano de melatonina e de outras funções neuroendócrinas em indivíduos com TEA foi investigada anteriormente (KULMAN et al., 2000), e foi demonstrado falta de ritmicidade normal em 72% dos indivíduos e ritmicidade invertida em 38%. Nos estudos de Tordjman et al. (2012) dos 43 indivíduos estudados com TEA, 70% apresentaram ritmicidade normal, 8% ritmicidade invertida, e 22% não apresentaram ritmicidade.

O fato dos estudos que referem ritmicidade de melatonina em indivíduos com TEA apresentarem, assim como o nosso, resultados sempre muito variáveis dentro da população estudada, ou seja, alguns indivíduos com ritmicidade normal, outros invertidos e outros indivíduos ainda sem variação, pode ser devido à heterogeneidade das manifestações clínicas nesta população (TORDJMAN et al., 2005; TORDJMAN et al., 2012; CORTESI et al., 2011)

A melatonina quantificada no plasma e na saliva, ou de forma indireta através da aMT6s na urina é considerado o melhor indicador periférico de temporização circadiana humana (ARENDRT et al., 2006). Alterações em sua ritmicidade geralmente se refletem em alterações de outras variáveis rítmicas e vice-versa (BOURGERON, 2007). Assim, o fato de evidenciarmos alterações rítmicas no padrão de aMT6s em TEA pode significar que

isto seja acompanhado por alterações em outras variáveis circadianas nesta população (GABRIELS et al., 2013), mas esta hipótese ainda deve ser investigada.

Quanto às funções deste hormônio e conseqüências de seu déficit há evidências crescentes de que a melatonina também está criticamente envolvida no início do desenvolvimento por meio de seus efeitos diretos sobre a placenta, neurônios e células da glia, e na ontogenética com estabelecimento dos ritmos diários (NILES et al., 2004; IWASAKI et al., 2005). Boucher (2000) sugere que problemas de temporização no relógio biológico poderiam ter conseqüências fisiológicas e psicológicas envolvidas na patogênese de indivíduos com TEA.

As causas para o baixo conteúdo noturno e diurno de melatonina e conseqüente alteração na ritmicidade deste hormônio em indivíduos com TEA foram pouco elucidadas nesta população. Em estudo que usou de uma combinação de genética e técnicas bioquímicas, sugeriu-se que a deficiência no conteúdo de melatonina não foi uma conseqüência, mas uma característica primária causada por uma deficiência na enzima HIOMT (MELKE et al., 2008). Outro estudo sugere que a expressão significativamente reduzida do gene que codifica a AA-NAT nos indivíduos com TEA poderia explicar o baixo conteúdo de melatonina nesses indivíduos (HU et al., 2009).

Outra possibilidade que deve ser levantada é a de que estes indivíduos podem sofrer um bloqueio na produção de melatonina causado pela elevação dos níveis de citocinas inflamatórias. Em algumas situações de injúria agentes pró-inflamatórios como citocinas, principalmente a citocina pró-inflamatória TNF, podem suprimir a produção de melatonina pela glândula pineal, deixando o organismo nestes casos de ser informado da existência do escuro (JAWOREK; BRZOWSKI; KONTUREK, 2005; MARKUS et

al., 2007).

Os nossos resultados mostraram que a concentração noturna de TNF foi significativamente aumentada nos indivíduos do GP em comparação a indivíduos do GC. Estes resultados estão concordantes com resultados anteriores (JYONOUCHI, LE, 2000; ASHWOOD et al., 2011), que também mostraram diferenças entre grupos, mas que com a média dos valores elevados quando comparados ao nosso estudo, que apresentamos valores médios noturno de TNF de 4,2 (variando de 0,2 a 6,2 pg/ml) em indivíduos do GP comparados a 1,8 pg/ml (variando de 1,8 a 2,0 pg/ml) do GC e diurno 2,2 pg/ml (variando de 0,1 a 3,0 pg/ml) para o GP e 1,7 (variando de 0,3 a 1,7 pg/ml) para o GC, e contraria um estudo que não apresentou diferenças entre o conteúdo de TNF entre indivíduos com TEA e controles (VIJENDRA, SINGH, 1995). Esses estudos, diferentemente no nosso, quantificaram o TNF por meio do plasma e não diferenciaram os períodos (diurno e noturno) para dosagem desta citocina.

Jyonouchi, Le (2000) relataram em indivíduos com TEA (idade entre 2 a 14 anos) valores médios para TNF de 71.9 pg/ml (variando de 3.9 a 765.4 pg/ml) e de < 3,9 (variando de 3.39 a 154.7 pg/ml) para indivíduos controles. Os valores médios de TNF encontrados por Ashwood et al. (2011) em indivíduos com TEA, estiveram em 81.8 pg/ml (variando de 34.5 a 204.7 pg/ml) e de 63.9 pg/ml (variando de 20.7 a 128.1 pg/ml) para indivíduos controles. No estudo de Vijendra, Singh (1995) indivíduos com TEA e controles apresentaram valores abaixo de 1 pg/ml.

Quanto à citocina IL-6, nossos resultados não mostraram diferenças significativas no conteúdo salivar desta citocina entre indivíduos do GP e GC em nenhum dos períodos estudados, o que contraria os dados apresentados por ASHWOOD et al. (2011a, 2011b),

que a quantificaram no plasma e encontraram valores superiores quando comparados a indivíduos controles e vai de encontro aos resultados apresentados por Sorrentino et al. (2012).

Tais citocinas inflamatórias também foram encontradas no córtex cerebral (VARGAS et al., 2005, GRIGORENKO et al., 2008, VOINEAGU et al., 2011; ZIATS, RENNERT, 2011) e no tracto gastrointestinal (DEFELICE et al., 2003; ASHWOOD et al., 2004) de indivíduos com TEA. Além disso, estudos sugerem que desequilíbrios em diversas citocinas durante o desenvolvimento e/ou ao longo da vida podem afetar a atividade neural e mediar os aspectos comportamentais destes indivíduos (ASHWOOD et al., 2004, LEE et al., 2010).

Os mediadores inflamatórios, citocinas e seus receptores, estão presentes no SNC de indivíduos saudáveis durante a diferenciação neuronal e plasticidade. A citocina pró inflamatória TNF tem sido associada com toxicidade de oligodendrócitos, crescimento de neuritos e regulação da plasticidade sináptica homeostática no hipocampo (BARKER et al., 2001;. CACCI et al., 2008;. MUNOZ-FERNANDEZ, FRESNO, 1998). Assim, quando há um desequilíbrio dessa citocina podem surgir efeitos biológicos sobre o desenvolvimento neuronal e atividade que afetam negativamente o comportamento (LEE et al., 2010).

6.3 Influência do conteúdo de aMT6s nos distúrbios do sono e nas citocinas TNF e IL-6 em indivíduos com TEA (GP) e controle (GC).

Na investigação sobre a influência do conteúdo de aMT6s nos distúrbios do sono, nossos resultados mostraram que o conteúdo de aMT6s influenciou negativamente nos distúrbios respiratórios do sono no GP o que vai de encontro com resultados anteriores que mostram que quanto maior a aMT6s, melhor é a qualidade de sono em indivíduos com TEA (LEU et al., 2009). A alteração na síntese de melatonina foi sugerida como responsável pela dificuldade no início e manutenção do sono em TEA, havendo hipóteses de que indivíduos com problemas para iniciar a fase de sono podem ter um ritmo de melatonina com pico no final da noite, enquanto a redução na amplitude do ritmo pode resultar na fragmentação do sono e no despertar antes do horário normal (ROSSIGNOL, FRYE, 2011). Tordjman et al. (2005) em seus estudos, apesar de não terem investigado a correlação entre o conteúdo de aMT6s com a presença de distúrbio do sono, mostraram que estes estiveram negativamente relacionados a à severidade dos sintomas clínicos nas TEA.

As análises de correlação entre aMT6s e citocinas mostraram que o conteúdo de TNF não influenciou nas concentrações de aMT6s e vice versa. Embora os dados de correlação não tenham alcançado significância estatística, o conteúdo de TNF noturno esteve significativamente maior em indivíduos do GP. Nenhum outro estudo correlacionou estas variáveis nesta população, no entanto há um conceito bem estabelecido de que esta citocina em altas concentrações pode causar uma inibição na síntese de melatonina pela glândula pineal (FERREIRA et al., 2005; FERNANDES et al., 2006). O TNF inibe transientemente a transcrição do gene que codifica a enzima AA-NAT e também a

produção do precursor da melatonina, a N-acetilserotonina, em glândulas pineais de ratos em cultura (FERNANDES et al., 2006). Mulheres com mastite, um processo inflamatório não-infeccioso, apresentam altos níveis de TNF e têm supressão do ritmo de melatonina (PONTES et al., 2006). No mesmo contexto de uma resposta pró-inflamatória, a injeção de LPS promove a redução dos níveis plasmáticos de melatonina em ratos (TAMURA et al., 2010) e inibição da produção de N-acetilserotonina e melatonina induzida por noradrenalina em pineais em cultura (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010). Observou-se ainda que em quadros de infecção generalizada, caracterizada por altos níveis de TNF, há supressão do ritmo de melatonina (MUNDIGLER et al., 2002). Desta forma a existência desta condição em TEA não deve ser desconsiderada.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo obtivemos um conjunto de resultados que indicam que:

- Em relação ao controle indivíduos com TEA apresentaram conteúdo de aMT6s menor durante o período noturno e acumulado e este influenciou negativamente nos distúrbios respiratórios do sono.
- Dentre os indivíduos com TEA, 49 % apresentaram ritmicidade circadiana normal, 11% ritmo invertido e 40% não apresentaram ritmicidade.
- O TNF esteve significativamente aumentado nos indivíduos com TEA em comparação a indivíduos controles, enquanto a citocina IL-6 apresentou níveis semelhantes ao controle.
- Os distúrbios de sono mais frequentes nos indivíduos com TEA foram: distúrbio de início e manutenção do sono, distúrbio respiratório de sono e a hiperhidrose do sono, além destes, estes indivíduos apresentaram problemas de sono como roncos, transpiração noturna, seguidas por longos períodos de acordares noturno e de maior frequência desses acordares do que os controles.
- Os indivíduos com TEA apresentaram problemas comportamentais do tipo pensamento, atenção e internalizantes. Quando comparados aos controles, estes tiveram diferença para os problemas do pensamento, atenção, retraimento, atenção e problemas totais do comportamento.
- Os distúrbios do sono influenciaram negativamente nos problemas do comportamento do tipo de pensamento, internalizante e totais do comportamento.

8 REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, T. M. *Manual for the child behavior checklist/ 4-18 and profile*. Burlington, VT: University of Vermont Department of Psychiatry, 1991.
- AJURIAGUERRA, J. Las Psicosis Infantiles In: Manual de Psiquiatria Infantil. 4ª Ed. Barcelona: Toray-Masson, 1977. p. 673-731.
- AKABOSHI, S. et al. Case of a mentally retarded child with non-24 hour sleep-wake syndrome caused by deficiency of melatonin secretion. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, v.54, n.3, p.379-380, 2000.
- ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, v.2, n.10, p.734-44, 2001.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais - DSM IV-Tr*. Porto alegre: Artes Médicas, 2002.
- AMIR S.; STEWART J. Resetting of the circadian clock by a conditioned stimulus. *Nature*, v.379, p.542-45, 1996.
- ANDRADE, M. M. M.; BENEDITO-SILVA, A. A.; DOMENICE, S.; ARNOLD, I. J. P.; MENNA-BARRETO, L. Sleep characteristics of adolescents: a longitudinal study. *J Adoles Health*, v.14, p.401-406, 1993.
- ANDRE, E. et al. Expression and functional pharmacology of the bradykinin B1 receptor in the normal and inflamed human gallbladder. *Gut*, London, v.57, n.5, p.628-633, May 2008.
- ASHWOOD, P.; WAKEFIELD A. J. Immune activation of peripheral blood and mucosal CD3+ lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms. *J Neuroimmunol.*, v.173, n.1-2, p.126-34, 2006.
- ASHWOOD P.; et al. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun.*, v.25, n.1, p.40-5, 2011.
- AUTISM AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES MONITORING NETWORK, UNITED STATES (CDC). Prevalence of autism spectrum disorders. *MMWR Surveillance Summaries*, v.58, n.1, p.57-66, 2009.
- BAIRD G., et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP).

- Lancet.*,v.15;n.368,p.210-5, 2006.
- BAILLIE S. R.; PRENDERGAST B. J. Photoperiodic regulation of 482 behavioral responses to bacterial and viralmimetics: A test of 483 the winter immunoenhancement hypothesis. *J Biol Rhythms*, v.23, n.1, p.81, 2008.
- BENEDITO-SILVA, A. A. Aspectos metodológicos da cronobiologia. In: Marques N, Menna-Barreto L, editores. Cronobiologia: princípios e aplicações. 3° ed. São Paulo: Edusp, 2003;297-320.
- BENROS M. E.; MORTENSEN P. B.; EATON W. W. Autoimmune diseases and infections as risk factors for schizophrenia. *Ann N Y Acad Sc*,v.1262,p.:56-66, 2012.
- BRIGO, F.; DEL FELICE A. Melatonin as add-on treatment for epilepsy. *Cochrane Database Syst Rev.*,v.13,n.6,2012.
- BORDIN, I. A. S.; MARI, J. J.; CAEIRO, M. F. Validação da versão brasileira do “Child Behavior Checklist” (CBCL). Inventário de Comportamentos da Infância e de Adolescência: Dados preliminares. *Rev. ABP-APAL*, v.17, n.2, p.55-66, 1995.
- BORDIN, I. A. S.; PAULA, C. S.; DUARTE, C. S. *Child Behavior Checklist: versão brasileira*, Achenbach, University of Vermont, 2001.
- BRUNI, O. et al. The Sleep Disturbance Scale for children (SDSC). Construction and validation of an instrument to evaluate sleep disturbances in childhood and adolescence. *J Sleep Res.*, v.5, p.251-261, 1996.
- BUTTS, C. L. & STERNBERG, E. M. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cellular Immunology*,v.252,p.7-15, 2008.
- BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. *Wheater histologia funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 409 p.
- CARVALHO-SOUSA et al. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. *Front Endocrinol (Lausanne)*,v.2,p.10, 2011.
- CARDINALI D. P.; FURIO A. M.; BRUSCO L. I. Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression. *Curr Neuropharmacol.*,v.8,n.3,p.218-27, 2010.
- CECON, E. et al. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int.*, v.27, n.1, p.25-67, 2010.
- CHERVIN, R. D. et al. Sleep-disordered breathing, behavior, and cognition in children

- before and after adenotonsillectomy. *Pediatrics.*, v.117,n.4, p.769-778, 2006.
- CHEZ, M. G. et al. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatr. Neurol.*,v.36, n.6, p.361–365, 2007.
- CORREALE, J.; VILA, A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol.*,v.251,n.11,p.1304-16,2004.
- CORTESI, F. et al. Sleep in children with autistic spectrum disorder. *Sleep Med.*, v.11, p.659-664, 2010.
- DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res.*,v. 49,p.183–192,2010.
- DEMAS, G. E.; NELSON, R. J. Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol.*, v.71, n.4, p.511, 2006.
- DUNN A. J. Mechanisms by which cytokines signal the brain. *Int Ver Neurobiol.*,p.43-65,2002.
- DRESLER M. et al. The interaction between sleep quality and academic performance *J Psychiatr Res.*,v.46,n.12,p.1618-22, 2013.
- ELIA, M. et al. Sleep in subjects with autistic disorder: a neurophysiological study. *Brain Dev.*, v.22, p.88–92, 2000.
- ELIAS, A.V. Autismo e Qualidade de vida. (2005). Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade de Campinas, Campinas, 2005.
- EL SAYAH, M. et al. Mechanisms underlying lipopolysaccharide-induced kinin B1 receptor up-regulation in the pig iris sphincter in vitro. *Mol. Pharmacol.*, Bethesda, v.69, n.5, p.1701-1708, May 2006.
- FALLONE, G. et al. Effects of acute sleep restriction on behavior, sustained attention, and response inhibition in children. *Percept. Mot. Skills*, v.93, n.1, p.213-229, 2001.
- FELLENBERG, A. J.; PHILLIPOU, G.; SEAMARK, R. F. Measurement of urinary production rates of melatonin as an index of human pineal function. *Endocr. Res. Commun.*, v.7, p.167–175, 1980.
- FERNANDES, P.A. et al. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a “feedback” of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res.*,v.41,p.344-250, 2006.
- FERNANDES, P.A. et al. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal

- melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol.*,v. 21,p. 90-97,2009.
- FERREIRA, Z. S. et al. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J. Pineal Res.*, New York, v.38, n.3, p.182-188, Apr. 2005.
- FERREIRA, V.; R. Sleep Disturbance Scale for Children: Translation, cultural adaptation, and validation. *Sleep Medicine*, v.10, p.457–463, 2009.
- FETT-CONTE A.; C. Genetic Counseling in Autistic Phenotypes. In: Lorkovic I, editor. *Autism/Book 4*. Rijeka: Intech, 2011:181-98
- FOLSTEIN, S. E.; ROSEN-SHEIDLEY, B. Genetics of autism: complex etiology for a heterogeneous disorder. *Nat. Rev. Genet.*, v.2, n.12, p.943–955, 2001.
- FOMBONNE, E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*,v. 66,p.3-8, 2005.
- FRIDMACHER, V. et al. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J. Neurosci.*, v.23, n.28, p.9403-9408, 2003.
- FRIEDMAN, B. C. et al. Adenotonsillectomy improves neurocognitive function in children with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep*, v.26, n.8, p.999-1005, 2003.
- FINOCCHIARO, L. M. et al. Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: Stimulation by interferon-gamma as part of the immunomodulatory pathway. *J. Interferon Res.*, New York, v.8, n.6, p.705–716, Dec. 1988.
- GALLI-CARMINATI, G.; DERIAZ, N.; BERTSCHY, G. Melatonin in the treatment of chronic sleep disorders in adults with autism: a retrospective study. *Swiss Med. Wkly*, v.139, n.19/20, p.293-296, 2009.
- GARSTANG, M. WALLIS. Randomized controlled trial of melatonin for children with autistic spectrum disorders and sleep problems. *J Child Adolesc Psychopharmacol.*,v.13,n.1,p.83-95,2003.
- GILLBERG, C. Asperger syndrome and high-functioning autism. *British Journal of Psychiatry*,v.172, p.200– 209, 1998.
- GUÉNOLÉ F.; BALEYTE J. Effectiveness of melatonin for sleep problems in autism spectrum disorders: Evidence grows but research is still needed. *J Autism Dev Disord.*, (Epub ahead of print), 2010.

- GUÉNOLÉ F.; et al. Melatonin for disordered sleep in individuals with autism spectrum disorders: systematic review and discussion. *Sleep Med Rev.*,v.15,n.6,p.379-87, 2011.
- GOINES P, VAN DE WATER J. The immune system's role in the biology of autism. *Curr Opin Neurol.*,v.23,n.2,p.111-7, 2010.
- GUPTA, A. R.; GUPTA, M.; KOHLI, K. Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain. *Indian J Physiol Pharmacol*, v.47,n.4,p.373-86, 2003.
- HAYASHI, E. Effect of melatonin on sleep–wake rhythm: the sleep diary of an autistic male. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, v.54, n.3, p.383–384, 2000.
- HOFFMAN, C. D. et al. Children with autism: Sleep problems and mothers' stress. *Focus on Autism and Other Developmental Disabilities*, v.23, n.3, p.155-165, 2008.
- IGUCHI, H.; KATO, K. J.; IBAYASHI, H. Age-dependent reduction serum melatonin concentration in healthy human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.55, p.27–29, 1982a.
- ITOH, M. T. et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol. Hum. Reprod.*, Oxford, v.5, n.5, p.402-408, May 1999.
- JAN, J. E.; O'DONNELL, M. E. Use of melatonin in the treatment of pediatric sleep disorders. *J. Pineal Res.*, v.21, n.4, p.193–199, 1996.
- JAN, J. E.; FREEMAN, R. D.; FAST, D. K. Melatonin treatment of sleep-wake cycle disorders in children and adolescents. *Dev. Med. Child. Neurol.*, v.41, n.7, p.491-500, 1999.
- JAN, J. E.; FREEMAN, R. D. Melatonin therapy for circadian rhythm sleep disorders in children with multiple disabilities: what have we learned in the last decade? *Dev. Med. Child. Neurol.*, v.46, n.11, p.776–782, 2004.
- JAWOREK, J.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *J. Pineal Res.*, New York, v.38, n.2, p.73-83, Mar. 2005.
- JYONOUCHI H.; SUN S.; LE H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J Neuroimmunol.*,v,120, n.1-2,p.170-9, 2001.
- JONSSON, L. et al. Mutation screening of melatonin-related genes in patients with autism

- spectrum disorders. *BMC Med Genomics*, v.8, p.3-10, 2010.
- KANNER, L. Affective disturbances of affective contact. *Nervous Child*, v. 2, p. 217-250, 1943.
- KALTSCHMIDT B.; KALTSCHMIDT C. Constitutive NF-kappa B activity is modulated via neuron-astroglia interaction. *Exp Brain Res*, v.30, p.100-104., 1994.
- KULMAN, G. et al. Evidence of pineal endocrine hypofunction in autistic children. *Neuroendocrinol Lett*, v.21, p.31-34, 2000.
- LEU, R. M. et al. Relation of Melatonin to Sleep Architecture in Children with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v.41, p. 427-433, 2011.
- LI, X. et al. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J. Neuroimmunol.*, v.207, n.1/2, p.111–116, 2009.
- LOTUFO, C.M.C. et al. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leucocyte rolling and adhesion torat microcirculation. *Eur J Pharmacol*.v.430,p.351-357,2001.
- MARÇOLA M.; et al. Endothelial cell adhesiveness is a function of environmental lighting and melatonin level. *J Pineal Res*. 2012 Jun 20. doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.01025.x. [Epub ahead of print]
- MARTINS JUNIOR, E. et al. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, New York, v.75, n.6, p.1116-1121, June 2004.
- MARKUS, R. P. et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, v.14, n.3/4, p.126-133, 2007.
- MOLLOY, C. A. et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J. Neuroimmunol.*, Amsterdam, v.172, n.1/2, p.198–205, Mar. 2006.
- MOURÃO Jr. C. A. Questões em bioestatística: o tamanho da amostra. *Rev Interdisc Est Experim*, v.1,p.1:26-8, 2009.
- MYAMOTO, A. et al. Serum melatonin kinetics and long-term melatonin treatment for sleep disorders in Rett syndrome. *Brain Dev.*, v.21, n.1, p.59–62, 1999.
- MELKE, J. et al. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*, v.13, n.1, p.90-8, 2008.
- MOZAFFARI S.; ABDOLLAHI M. Melatonin, a promising supplement in inflammatory. *Curr Pharm*, v.17;38, p.4372-8, 2011.

- NELSON, K. B.; GREYER, J. K.; CROEN, L. A. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann. Neurol.*, v.49, n.5, p.597–606, 2001.
- NIR, I. et al. Brief report: circadian melatonin, thyroid-stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism. *J. Autism Dev. Disord.*, v.25, n.6, p.641– 654, 1995.
- NIR, I. Melatonin for the treatment of disorders in circadian rhythm and sleep: could it form a basis for medication? *Receptors Channels*, London, v.9, n.6, p.379-385, 2003.
- O'BRIEN, L. M.; GOZAL, D. Review sleep in children with attention deficit/hyperactivity disorder. *Minerva Pediatr.*, v.56, n.6, p.585-601, 2004.
- O'NEILL, L. A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.*, Amsterdam, v.20, n.6, p.252-258, June 1997.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde: CID-10. 10ª revisão. São Paulo: OMS; p. 361-362, 2002
- PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin Antioxidative Defense: Therapeutical Implications for Aging and Neurodegenerative Processes. *Neurotox Res.*,v.28, 2012 [Epub ahead of print].
- PAGAN C. et al. Mutation screening of ASMT, the last enzyme of the melatonin pathway, in a large sample of patients with intellectual disability. *BMC Med Genet.*,v.20,p.12-7, 2011.
- PARHAM, D. M. Neuroectodermal and neuroendocrine tumors principally seen in children. *Am J Clin Pathol.*,v.115,p.113-28, 2001.
- PARDO C.A, EBERHART CG. The neurobiology of autism. *Brain Pathol.* 2007 Oct;17(4):434-47.
- PATZOLD, L. M.; RICHDALE, A. L.; TONGE, B. J. An investigation into sleep characteristics of children with autism and Asperger's disorders. *J. Paediatr. Child Health*, v.34, n.6, p.528–533, 1998.
- PAAVONEN, E. J. et al. Effectiveness of melatonin in the treatment of sleep disturbances in children with Asperger disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol.*,v.13,p.83–95,

2003.

- PEREIRA, A. M. Autismo infantil: tradução e validação da CARS (childhood autism rating scale) para uso no Brasil. 2007. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas: Pediatria)–Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- PERRY, V. H.; BELL, M. D.; BROWN, H. C.; MATYSZAK, M. K. Inflammation in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.*,v.5,p.636-41, 1995.
- PONTES, G. N. et al. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J. Pineal Res.*, New York, v.41, n.2, p.136-141, Sept. 2006.
- RATEY, J. J. et al. Autism: the treatment of aggressive behaviors. *J. Clin. Psychopharmacol.*, v.7, n.1, p.35-41, 1987.
- RICHDALE, A. L. Sleep problems in autism: prevalence, cause, and intervention. *Dev. Med. Child Neurol.*, v.41, n.1, p.60–66, 1999.
- RICHDALE, A. et al. Stress, behaviour, and sleep problems in children with an intellectual disability. *J. Intellect. Dev. Disabil.*, v.25, n.2, p.147–161, 2000.
- RITVO, E. R. et al. Elevated daytime melatonin concentrations in autism: a pilot study. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry.*, v.2, n.2, p.75–78, 1993.
- ROSS, C.; DAVIES, P.; WHITEHOUSE, W. Melatonin treatment for sleep disorders in children with neurodevelopmental disorders: an observational study. *Dev. Med. Child Neurol.*, v.44, n.5, p.339–344, 2002.
- REITER R.J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. *News Physiol Sci.*,v.15,p.246-250, 2000.
- REITER R.J; et al. Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther.*,v.8,n.4,p.354-60, 2009.
- RUTTER M. Autism: its recognition, early diagnosis, and service implication. *J Dev Behav Pediatr.*,v.27,n.2,p.S54-8, 2006.
- ROSSIGNOL D. A.; FRYE R.E. Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.*,v.53,n.9,p.783-92, 2011.
- SCHWICHTENBERG, et al. Behavior and Sleep Problems in Children With a Family History of Autism. *Autism Res.* 2013.

- SIKORA D. M. et al. The relationship between sleep problems and daytime behavior in children of different ages with autism spectrum disorders. *Pediatrics.*, 2013.
- SCHOPLER, E.; REICHLER, J. R.; RENNER, C. *CARS-The Childhood Autism Rating Scale*. 10th ed. Los Angeles, CA: Western Psychological Services, 1988.
- SCHOPLER, E. et al. Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J Autism Dev Disord.*,v.10, n.1, p.91–103, 1980.
- SCHRECK, K. A.; MULICK, J. A.; SMITH, A. F. Sleep problems as possible predictors of intensified symptoms of autism. *Res. Dev. Disabil.*,v.25, n.1, p.57–66, 2004.
- SCHOPLER E.; REICHLER R. J.; RENNER B. R. The childhood autism rating scale (CARS). Los Angeles, Ca: Western Psychological Services; 1988.
- SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.*, v.55, n.2, p.325-395, 2003.
- SMEDJE, H.; BROMAN, J. E.; HETTA, J. Associations between disturbed sleep and behavioural difficulties in 635 children aged six to eight years: a study based on parents' perceptions. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry.*,v.10,n.1, p.1-9, 2001_a.
- STREIT W. J.; MRAK R. E.; GRIFFIN W. S. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation.*,v.1,n.14, 2004.
- SMEDJE, H.; BROMAN, J. E.; HETTA, J. Short-term prospective study of sleep disturbances in 5-8-year-old children. *Acta Paediatr.*,v.90, n.12, p.1456-1463, 2001_b.
- SORRENTINO, J. et al. Níveis séricos de citocinas inflamatórias no transtorno autista: um estudo caso-controle. *Salão de Iniciação Científica*, out. 3-7: UFRGS, Porto Alegre, RS, 2011.
- STEINER C, E.; GUERREIRO M. M.; MARQUES-DE-FARIA A. P. Genetic and neurological evaluation in a sample of individuals with pervasive developmental disorders. *Arq Neuropsiquiatr.*,v.61,n.2^A,p.176-80, 2003.
- SZCZEPANIK, M. Melatonin and its influence on immune system. *J Physiol Pharmacol.*, v.58, n.6, p.115, 2007.

- TAMURA E. K.; SILVA C. L.; MARKUS R. P. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res.*,v.41,n.3,p.267-74, 2006.
- TAMURA E. K. et al. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res.*,v.46;3,p.268-74, 2009.
- TUCHMAN, R.; RAPIN, I. *Autismo: abordagem neurobiológica*. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TZISCHINSKY, O.; SHLITNER A.; LAVIE P. The association between the nocturnal sleep gate and nocturnal onset of urinary 6-sulfatoxymelatonin. *J Biol Rhythms.*,v.8,n.3,p.199-209, 1993.
- TAN, D. X. et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, v.85, n.3, p.607, 2010.
- TILDEN, A. R. et al. Modulatory effects of melatonin on behavior, hemolymph metabolites, and neurotransmitter release in crayfish. *Brain Research*, v. 992, n.2, p.252-262, 2003.
- TOMA S-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.*, v.39, n.2, p.99, 2005.
- TOMA C. et al. Is ASMT a susceptibility gene for autism spectrum disorders? A replication study in European populations. *Mol Psychiatry.*,v.12;p.977-79,2007.
- TORDJMAN S. et al. Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder. *Biol Psychiatry.*,v.57,n.2,p.134-8
- TORDJMAN S. et al. Day and nighttime excretion of 6-sulphatoxymelatonin in adolescents and young adults with autistic disorder. *Psychoneuroendocrinology.*, 2012 May 19. [Epub ahead of print]
- TSAI, S.Y. & MCNULTY, J.A. Interleukin-1beta expression in the pineal gland of the rat. *J Pineal Res.*,v.7,p.42-48, 1999.
- TSAI, S.Y. et al. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.*,v.303,p.423-431, 2001b.
- TSAI, S.Y. et al. TGF-beta1 and IL-6 expression in rat pineal gland is regulated by norepinephrine and interleukin-1beta. *Histol Histopathol.*v.16,p.1135-1141, 2001a..

VIJENDRA K. S. Plasma increase of interleukin- 12 and interferon-gamma Pathological significance in autism. *Journal of Neuroimmunology*,v. 66,p. 143- 145, 1996.

Anexo 1. CEP da Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília (Processo 1001/2011).

		UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Marília
		Parecer do Projeto nº. 0101/2011
Ao		
1. Título do Projeto: Sono-vigília, comportamento e desempenho comunicativo: correlações entre níveis de melatonina e citocinas em crianças do espectro autístico		
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:		
Autor(a): Cintia Fadini		
Orientador(a): Luciana Pinato		
3. Instituição do Pesquisador: Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP/Marília		
4. Apresentação ao CEP: 11/05/2011		
5. Apresentar relatório em: Semestralmente durante a realização da pesquisa		
Objetivos		
Objetivo geral • Caracterizar o sono-vigília, comportamento e desempenho comunicativo de crianças do EA e seus respectivos controles e estabelecer as bases moleculares que promovem estas disfunções, investigando os níveis de melatonina e citocinas inflamatórias nestes casos. Objetivos específicos • Caracterizar o sono-vigília, comportamento e desempenho comunicativo de crianças do EA e seus respectivos controles; • Analisar os níveis de melatonina e citocinas inflamatórias de crianças do EA e seus respectivos controles; • Correlacionar o sono-vigília, comportamento, desempenho comunicativo, níveis de melatonina e citocinas inflamatórias entre crianças do EA e seus respectivos controles.		
SUMÁRIO DO PROJETO		
O espectro autístico, conjunto heterogêneo de síndromes de etiologia hereditária ainda não totalmente esclarecida, possui um complexo quadro de sintomas que inclui frequentemente desordens severas no ciclo sono-vigília, tanto em crianças quanto no adulto jovem. Estes indivíduos também apresentam alterações comportamentais, instabilidade de humor, déficits nas funções neurocognitivas, incluindo memória, atenção, criatividade verbal, flexibilidade cognitiva e raciocínio abstrato durante o dia, que podem estar direta ou indiretamente correlacionadas com os problemas de sono. A melatonina, hormônio produzido principalmente pela glândula pineal na fase de escuro, é capaz de modular a qualidade do sono, graças a sua função como transdutora da informação fotoperiódica ambiental. Esta talvez seja sua função mais estudada, mas esta molécula possui amplo espectro de ações que incluem funções antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora, além de aprimoramento de estabilidade dendrítica. Sua produção, controlada pelos núcleos supraquiasmáticos, é modulada pelo ciclo-claro-escuro e também por moléculas que sinalizam inflamação. A investigação da alteração na produção de melatonina em casos do espectro autístico correlacionada com a		
Pág. 1 de 2		
Faculdade de Filosofia e Ciências Avenida Hygino Muzzi Filho, 737 CEP 13.325-900 Marília - São Paulo (Brasil) Tel 14 3402-1300 fax 14 3402-1302		

Anexo 2. Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós estamos convidando seu filho a participar do projeto de pesquisa intitulado “Correlações entre produção de melatonina, sono-vigília e citocinas pró-inflamatórias em doenças do espectro autístico” do Departamento de Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília – UNESP, cujos responsáveis são Fga. Cintia Cristina Fadini e Prof. Dra. Luciana Pinato.

Participar deste projeto é uma opção de sua, podendo decidir participar ou não;

A qualquer momento você terá a liberdade de buscar junto aos responsáveis pelo projeto, esclarecimentos de qualquer natureza, inclusive os relativos à metodologia de trabalho.

Você receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O presente trabalho tem por objetivos:

- a) Caracterizar o comportamento e o sono em crianças do espectro autístico e seus respectivos controles;
- b) Analisar os níveis de melatonina e citocinas pró-inflamatórias (proteínas que sinalizam inflamação) em crianças do espectro autístico e seus respectivos controles;

Esperam-se obter os seguintes benefícios decorrentes da presente pesquisa: ampliar o conhecimento sobre as Doenças do Espectro Autístico e se possível um novo agente farmacológico;

Se você decidir participar gostaríamos de informar-lhes que:

- a) Os instrumentos de registro utilizados neste estudo incluem: Questionário do Sono e Comportamento, coleta de urina e amostra de 3ml de saliva (1 colher de sopa), sendo realizada a coleta em casa.
- b) Os resultados deste estudo talvez não sejam de benefício imediato para a população estudada.
- c) O material biológico será armazenado em nossos bancos de estoque.
- d) Os resultados poderão demorar meses para ficarem prontos;
- e) Assim que existam resultados, estes serão apresentados a você pelos responsáveis.
- f) Os resultados deverão ser publicados em revistas científicas que circulam entre os profissionais da saúde que tenham interesse nesta área.
- g) Sempre que ocorrerem publicações científicas a sua identidade será mantida em sigilo.
- h) Somente pesquisadores envolvidos com o projeto terão acesso aos dados completos, não sendo permitido o acesso aos dados por terceiros.

Eu, _____ portador(a) do RG _____ responsável por _____ concordo em participar do referido projeto de pesquisa.

Declaro estar ciente sobre os itens acima mencionados e ter recebido as devidas explicações sobre o referido projeto, sendo a minha participação voluntária.

Responsável

Cíntia Cristina Fadini – e mail cinfadini@gmail.com (14) 8822-2012

Profa. Dra. Luciana Pinato- e mail lpinato@marilia.unesp.br

Av. Hygino Muzzy Filho 737 - Dept. Fonoaudiologia UNESP/Marília – SP (14) 3402-1324

Anexo 3. Orientação de Coleta Urina e Saliva

Você está participando do projeto de pesquisa intitulado: “Correlação entre melatonina, sono-vigília e citocinas pró-inflamatórias em Doenças do Espectro Autístico”.

A seguir serão apresentadas as instruções de coleta para o estudo, lembrando que é muito importante que estas sejam realizadas exatamente conforme indicado.

1. COLETA DE URINA

a) No primeiro dia (segunda-feira), quando a criança acordar, ela deverá fazer xixi (esvaziar a bexiga) normalmente pela manhã e esta urina não será usada, será descartada.

b) A partir deste momento toda a urina produzida e liberada nos próximos 3 dias (segunda-feira, terça-feira, quarta-feira e quinta-feira) deverá ser coletada em frascos com etiquetas dadas pelas pesquisadoras que identificarão o nome da criança, dia e o horário da coleta. Para cada urina um frasco.

c) Terminará a coleta com a primeira urina da quinta-feira.

c) Caso seja necessário a coleta de urina no período da noite (para crianças que costumam espontaneamente urinar neste período) a coleta de urina deverá ser realizada com o menor uso de luz, no escuro, se possível.

2. COLETA DE SALIVA

a) As coletas de saliva serão realizadas na quarta-feira em 6 horários diferentes do dia (em um único dia), sendo na fase de claro (8:00h e 12:00h e 18h) e na fase de escuro (22:00h e 1:00h e 4:00h).

b) As coletas na fase escuro deverão ser realizada com o menor uso de luz, no escuro se possível.

c) Os materiais utilizados serão tubos plásticos com algodão específico para a coleta de saliva chamado de "Salivette®". Este dispositivo permite uma coleta fácil e limpa. Os "Salivette®" serão fornecidos pelas pesquisadoras e os procedimentos para a coleta serão:

1. Por um período de 1 hora antes da coleta não ingerir nenhum alimento ou bebida (com exceção de água).
2. Jejum não é necessário após dieta leve, ou 2 horas após as principais refeições (almoço ou jantar).
3. No período de coleta não é permitido ingestão de água, alimento ou qualquer tipo de líquido,
4. Será necessário o uso de luvas, fornecidas pelas pesquisadoras.
5. Remova a tampa superior do tubo,
6. Coloque o algodão presente no interior do "Salivette®", em baixo da língua e aguarde por um período de 2 a 3 minutos. Se o paciente preferir, pode mastigá-lo gentilmente para estimular o fluxo salivar, por um período de 2 a 3 minutos.
7. Quando notar que a esponja está bem embebida de saliva (normalmente ao fim de dois ou três minutos) volte a colocá-la no tubo pequeno e tampe bem. Indicar na etiqueta o correspondente a hora da coleta
8. Se possível, pedir para a criança ainda cuspir por cima do algodão, fechando com a tampa logo a seguir e levando ao congelador.
9. É necessário congelar após a coleta.

