

GEORGIA NEME

*Centro Universitário Lusíada, UNILUS,
Santos, SP, Brasil.*

CAMILA STARK RODRIGUES

*Centro Universitário Lusíada, UNILUS,
Santos, SP, Brasil.*

CAMILLA FRAMIL ROCHA

*Centro Universitário Lusíada, UNILUS,
Santos, SP, Brasil.*

VERA ESTEVES VAGNOZZI RULLO

*Centro Universitário Lusíada, UNILUS,
Santos, SP, Brasil.*

*Recebido em janeiro de 2020.
Aprovado em agosto de 2020.*

TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E METAIS PESADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

RESUMO

Introdução: o transtorno do espectro autista (tea) é um transtorno de desenvolvimento, de etiologia multifatorial e de grande importância epidemiológica, visto que sua incidência é de 1% da população mundial e quase dobrou nos últimos 10 anos. Os metais pesados são apontados como contribuintes importantes de sua etiologia, sendo que os prejuízos podem advir tanto da exposição perinatal quanto pós-natal. Estudos demonstram que tais toxinas interferem em vias fisiopatológicas diversas da doença, destacando-se a dificuldade de sua metabolização. **Objetivo:** o presente estudo visa reconhecer a relação e a influência dos níveis corporais de metais pesados em pacientes pediátricos diagnosticados com tea, a qual ainda não está completamente elucidada. **Materiais e métodos:** foi realizada uma revisão sistemática da literatura que abordou a concentração de metais pesados no organismo dos pacientes pediátricos com tea. A base de dado medline foi utilizada para recuperação total de 180 artigos. Destes, 3 ensaios clínicos controlados randomizados foram selecionados para a análise qualitativa e quantitativa. **Resultados:** considerando os três estudos eleitos, somente um demonstrou diferença significativa entre os valores de metais pesados nas amostras colhidas. No entanto, todos eles elucidaram o metabolismo ineficiente dos metais pesados nos pacientes com tea. **Conclusão:** apesar da dosagem direta dos metais pesados ter apresentado diferenças não significativas, sua participação na etiologia do tea é evidente, visto que eles se expressam em diferentes vias metabólicas apontadas pelos estudos.

Palavras-Chave: transtorno do espectro autista; metais pesados; chumbo; mercúrio; criança.

AUTISTIC SPECTRUM DISORDER AND HEAVY METALS: A SYSTEMATIC REVIEW

ABSTRACT

Introduction: autistic spectrum disorder (asd) is a developmental disorder with a multifactorial etiology of great epidemiological importance, as its incidence is 1% of the world population and has almost doubled in the last 10 years. Heavy metals are indicated as important contributors to their etiology, and damage may result from both perinatal and postnatal exposure. Studies have shown that such toxins interfere in pathophysiological pathways other than the disease, and the difficulty of its metabolization is highlighted. **Objective:** this study aims to recognize the relationship and influence of heavy metal body levels in pediatric patients diagnosed with asd, which has not yet been fully elucidated. **Materials and methods:** a systematic review of the literature on the concentration of heavy metals in pediatric patients with asd was carried out. The medline database was used to retrieve 180 articles. Of these, 3 randomized controlled clinical trials were selected for qualitative and quantitative analysis. **Results:** considering the three studies elected, solely one showed a significant difference between the values of heavy metals in the samples collected. However, they all elucidated the inefficient metabolism of heavy metals in patients with asd. **Conclusion:** although the direct dosage of heavy metals showed no significant differences, their participation in the etiology of asd is evident, since they are expressed in different metabolic pathways indicated by the studies.

Keywords: autistic spectrum disorder; heavy metals; lead; mercury; child.

INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um grupo de transtornos de desenvolvimento, de etiologia multifatorial, cujos primeiros sintomas podem aparecer dos 12-24 meses de idade, a depender da gravidade do caso. De forma geral, os primeiros sintomas são atrasos no desenvolvimento da linguagem e ausência de interesse social. No segundo ano de vida o quadro evolui com comportamentos repetitivos, interesses restritos e déficits comunicativos. Entre outras alterações podemos citar anormalidades cognitivas, do aprendizado, atenção e sensorial. A maioria dos pacientes com TEA tende a apresentar melhora dos sintomas ao longo dos anos. [1-4]

Atualmente, a prevalência de crianças e adultos com autismo é cerca de 1% da população mundial³. Um estudo conduzido em 2014 em 11 estados americanos determinou uma prevalência de 16,8 casos de TEA a cada 1.000 crianças com oito anos, equivalente a uma frequência de 1:59. Entre 2002-2012, a prevalência de TEA quase duplicou, partindo de um caso em 150 crianças para 1:68. Ao analisar a prevalência em relação ao sexo, a cada mil meninos 26,6 foram diagnosticados com TEA e cada mil meninas 6,6 diagnosticadas, resultando em uma razão de 4:1¹.

Apesar de diversos estudos referentes a prevalência do TEA, é importante frisar a dificuldade de estabelecer um valor de prevalência único³, devido a heterogeneidade dos sintomas e a ausência de exames laboratoriais específicos para o diagnóstico².

O diagnóstico do TEA é feito clinicamente a partir da observação clínica e relato de pais e/ou responsáveis, preenchendo os critérios do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5). A criança deve preencher 5 critérios de A-E, especificados na tabela abaixo referente ao documento F84.0, relativos a déficits persistentes na comunicação e interação social, padrões restritos e repetitivos de comportamento, presentes precocemente no desenvolvimento, com prejuízo social, não explicadas por deficiência intelectual ou atraso global do desenvolvimento³.

DSM-5: Critérios diagnósticos do Transtornos do Espectro Autista (F84.0)	
A	Déficits persistentes na comunicação social e interação social em múltiplos contextos, conforme manifestado por tudo que segue, atualmente ou por história prévia: <ol style="list-style-type: none"> Déficits na reciprocidade socioemocional, variando, por exemplo, de abordagem social anormal e dificuldade para estabelecer uma conversa normal a compartilhamento reduzido de interesses, emoções ou afeto, a dificuldade para iniciar ou responder a interações sociais. Déficits nos comportamentos comunicativos não verbais usados para interação social, variando, por exemplo, de comunicação verbal e não verbal pouco integrada a anormalidade no contato visual e linguagem corporal ou déficits na compreensão e uso de gestos, a ausência total de expressões faciais e comunicação não verbal. Déficits para desenvolver, manter e compreender relacionamentos, variando, por exemplo, de dificuldade em ajustar o comportamento para se adequar a contextos sociais diversos a dificuldade em compartilhar brincadeiras imaginativas ou em fazer amigos, a ausência de interesse por pares.
B	Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, conforme manifestado por pelo menos dois dos seguintes, atualmente ou por história prévia: <ol style="list-style-type: none"> Movimentos motores, uso de objetos ou fala estereotipados ou repetitivos (p. ex., estereotipias motoras simples, alinhar brinquedos ou girar objetos, ecolalia, frases idiossincráticas). Insistência nas mesmas coisas, adesão inflexível a rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal ou não verbal (p. ex., sofrimento extremo em relação a pequenas mudanças, dificuldade com transições, padrões rígidos de pensamento, rituais de saudação, necessidade de fazer o mesmo caminho ou ingerir os mesmos alimentos diariamente). Interesses fixos e altamente restritos que são anormais em intensidade ou foco (p. ex., forte apego a ou preocupação com objetos incomuns, interesses excessivamente circunscritos ou perseverativos). Hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum por aspectos sensoriais do ambiente (p. ex., indiferença aparente a dor/temperatura, reação contrária a sons ou texturas específicas, cheirar ou tocar objetos de forma excessiva, fascinação visual por luzes ou movimento).
C	Os sintomas devem estar presentes precocemente no período do desenvolvimento (mas podem não se tornar plenamente manifestos até que as demandas sociais excedam as capacidades limitadas ou podem ser mascarados por estratégias aprendidas mais tarde na vida).
D	Os sintomas causam prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo no presente.
E	Essas perturbações não são mais bem explicadas por deficiência intelectual (transtorno do desenvolvimento intelectual) ou por atraso global do desenvolvimento. Deficiência intelectual ou transtorno do espectro autista costumam ser comórbidos; para fazer o diagnóstico da comorbidade de transtorno do espectro autista e deficiência intelectual, a comunicação social deve estar abaixo do esperado para o nível geral de desenvolvimento.

Evidências demonstram que o diagnóstico precoce e a subsequente intervenção levam a um melhor prognóstico e melhorias na gama de sintomas de pacientes autistas⁵. Dessa forma, métodos como a escala Modified Checklist for Autism in Toddlers - M-CHAT (Robins et al. 2001), são valorizados como instrumentos que podem auxiliar no rastreamento de crianças com o transtorno.

O questionário é uma versão estendida do CHAT (Baron-Cohen et al., 2000), construído como instrumento de triagem de nível 1, isto é, diferencia os pacientes com TEA da população geral, para ser aplicado aos pais de crianças com 16 a 30 meses de idade. É composto por 23 itens em uma escala dicotômica do tipo sim/não⁶.

A versão revisada (M-CHAT-R/F; Robins, Fein, & Barton, 2009) acompanha uma Entrevista de Seguimento, disponível para download. Com base nas respostas do questionário, estabelece-se um algoritmo que estipula o risco de TEA e a conduta a ser tomada baseada neste resultado. Os itens cuja resposta for “NÃO” equivalem a um (01) ponto, exceto os itens 2, 5, e 12, onde a resposta “SIM” é a qual pontua⁶. Ao final da soma, os pacientes podem ser classificados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Algoritmo de pontuação do M-CHAT-R.

Pontuação	Risco	Conduta
0-2	BAIXO	Se a criança tiver menos de 24 meses, repetir o M-CHAT-R aos 24 meses. Não é necessária qualquer outra medida, a não ser que a vigilância indique risco de TEA
3-7	MODERADO	Administrar a Entrevista de Seguimento (segunda etapa do M-CHAT-R/F) para obter informação adicional sobre as respostas de risco. Se a pontuação do M-CHAT-R/F continuar a ser igual ou superior a 2, a criança pontua positivo na triagem. Medidas necessárias: encaminhar a criança para avaliação diagnóstica e para avaliação da necessidade de intervenção. Se a pontuação da Entrevista de Seguimento for 0-1, a criança pontua negativo. Nenhuma outra medida é necessária, a não ser que a vigilância indique risco de TEA
8-20	ALTO	Pode-se prescindir da Entrevista de Seguimento e encaminhar a criança para avaliação diagnóstica e também para avaliação da necessidade de intervenção

A etiologia do TEA é complexa e pautada na multifatorialidade, embora tais fatores ainda não sejam totalmente compreendidos⁷. Por se tratar de uma doença heterogênea em sua clínica e seus fenótipos, cujo diagnóstico é subjetivo e baseado em um grande número de critérios, há dificuldades no entendimento preciso de seus mecanismos⁸, o que é evidenciado pela inespecificidade dos dados obtidos com os estudos⁹. Destacam-se as evidências que apontam para a interação entre fatores genéticos e ambientais.

O fator genético aparece como um fator de risco bem elucidado¹⁰. Observa-se que traços autistas e fenótipos subclínicos mais amplos de TEA são hereditários e continuamente distribuídos na população¹¹. Um estudo desenvolvido em gêmeos em 2011 demonstra uma concordância em gêmeos monozigóticos de 76%, reforçando a estreita relação da hereditariedade. Contudo, tal relação ainda não aborda o espectro por completo, fortalecendo a sinergia da exposição ambiental. Em paralelo, diversos aspectos têm sido estudados para delimitar quais exposições estariam envolvidas na etiologia do TEA, tais como idade parental avançada, técnicas de reprodução assistida, fatores nutricionais, infecções maternas, medicações e toxinas ambientais, dentre elas os metais pesados¹⁰. Estes últimos, objeto de estudo deste trabalho, são apontados como importantes contribuintes. Com a tendência mundial expressiva de industrialização, observa-se aumento da exposição humana a tais xenobióticos¹², diminuição da permanência desses metais nos minérios, produção de novos compostos e alteração da distribuição desses elementos no planeta¹³.

Metais pesados são elementos naturais que exibem altos pesos atômicos e altas densidades. Em contato com o organismo, esses metais acabam atraindo para si dois elementos essenciais do corpo: proteínas e enzimas. Alguns usam dessa atração para o funcionamento de processos metabólicos, como por exemplo o cobre, que é necessário em pequena parcela para o melhor aproveitamento de Vitamina C e em alta concentração torna-se tóxico¹⁴. No entanto, uma parte significativa de metais pesados não tem papéis biológicos conhecidos, incluindo cádmio, chumbo e mercúrio, que ainda exibem alta toxicidade e propriedades nocivas quando consumidos por animais, incluindo seres humanos¹⁵.

Tais substâncias entram na categoria das neurotoxinas e parecem participar em vias fisiopatológicas diversas, dentre elas, no desenvolvimento de circuitos neurais e sinapses, migração celular e conectividade⁸, sendo que os prejuízos podem advir tanto da exposição perinatal quanto pós-natal¹². Diversos estudos tentam identificar de que forma essas toxinas atuam e se fazem presentes nos pacientes com autismo. A pesquisa sobre elementos tóxicos é amplamente limitada pelo seu design, mas há evidências suficientes para a associação entre alguns metais pesados - destacando-se o mercúrio inorgânico e o chumbo - e o TEA¹⁶. Foi hipotetizado que dificuldades em sua desintoxicação podem causar estresse oxidativo e desregulação imune, levando ou exacerbando a apresentação fenotípica de TEA¹⁷.

Baixos níveis de glutathiona total (GSH) tem mostrado afetar o sistema imunológico de crianças com autismo, como evidenciado por menor atividade celular natural killer (NK)¹⁷. A glutathiona é o antioxidante central responsável pela desintoxicação de causas ambientais e pode ser usada como biomarcador de estresse oxidativo para avaliar a metilação e sulfatação de sistemas¹⁸.

Tais afirmações reforçam o metabolismo de metais pesados do paciente com TEA como deficiente e de caráter autoimune. As células NK teriam sua ação atacando o tecido cerebral, de forma a contribuir para subconectividade entre áreas distantes do cérebro de crianças com autismo¹⁹.

Desta forma, torna-se necessária a organização e sistematização das últimas evidências sobre a relação entre o TEA e a concentração de metais pesados na população infantil, a fim de aprimorar o conhecimento científico.

OBJETIVO

O presente estudo visa reconhecer a relação e a influência dos níveis corporais de metais pesados em pacientes pediátricos diagnosticados com Transtorno do Espectro Autista, a qual ainda não está completamente elucidada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estratégia de busca

Este estudo consiste em uma revisão sistemática de ensaios clínicos controlados randomizados avaliando os níveis corporais de metais pesados e sua relação com o TEA na infância.

Para a seleção dos artigos foi realizada busca sistemática nas bases de dados primária MedLine, via Pubmed. Para a base MedLine foi utilizada a seguinte estratégia de busca: (Disorder, Autistic OR Disorders, Autistic OR Kanner's Syndrome OR Kanner Syndrome OR Kannerns Syndrome OR Autism, Infantile OR Infantile Autism OR Autism OR Autism, Early Infantile OR Early Infantile Autism OR Infantile Autism, Early OR Spectrum Disorders, Autism OR Autism Spectrum Disorders) AND (metals, heavy) AND (infant OR child).

Critérios de elegibilidade

Foram incluídos na revisão sistemática os seguintes artigos:

- a) população estudada de faixa etária pediátrica;
- b) ensaios clínicos controlados randomizados;
- c) cuja metodologia avalia a concentração de metais pesados no organismo;
- d) grupo de intervenção diagnosticados com TEA.

Foram excluídos da revisão sistemática os seguintes artigos:

- a) população estudada de faixa etária não pediátrica;
- b) estudos observacionais;
- c) revisões literárias;
- d) estudos realizados com animais.

Seleção dos artigos

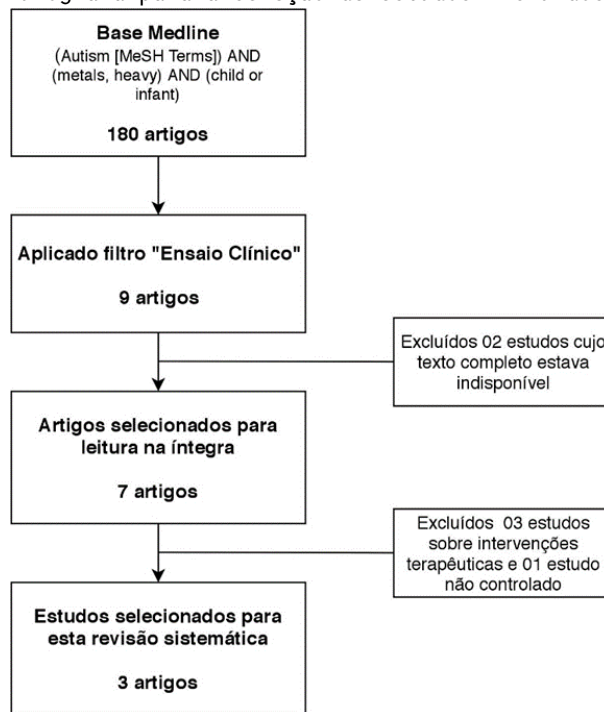
Após a busca sistemática na base de dados Medline, baseada na estratégia de busca estabelecida, foram obtidos 180 trabalhos. Foram aplicados os critérios de

inclusão e exclusão do trabalho, resultando em 9 trabalhos. Publicações das quais o artigo completo estava indisponível não foram consideradas, deste modo foram recuperados 7 trabalhos ao total, todos lidos na íntegra. A busca foi realizada no período de janeiro a fevereiro de 2019.

Após a leitura dos artigos selecionados, 3 artigos foram excluídos da análise por consistir em intervenções terapêuticas e 1 artigo por não apresentar grupo controle. Os 3 trabalhos restantes foram eleitos para esta revisão sistemática.

O processo de seleção dos artigos pode ser observado na figura abaixo:

Figura 1- Fluxograma para a seleção de estudos incluídos na análise.



Procedimentos de validação de Revisão Sistemática

- Busca dos estudos por pelo menos dois revisores, de forma independente;
- Avaliação e seleção dos estudos por pelo menos dois revisores, de forma independente;
- Extração dos resultados por pelo menos dois revisores, de forma independente;
- Reuniões semanais com o grupo de pesquisa para discutir e reformular a estratégia de busca, avaliar os resultados dos Ensaios Clínicos (EC), formular e reformular estratégias de avaliação;
- Documentação (audit trail) de todos os procedimentos, mudanças nos procedimentos e resultados.

Avaliação de desfechos

Na intenção de avaliar o impacto de metais pesados (alumínio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco) como fator prognóstico no TEA, os três Ensaios Clínicos Controlados revisados neste estudo utilizaram-se de critérios e parâmetros de relevância estatística e clínica para análise dos pacientes pediátricos.

Para esta revisão sistemática, o desfecho primário é a concentração de metal pesado na criança com TEA, dosada nos três artigos. Os desfechos secundários são (1) porfirinas urinárias, (2) estresse oxidativo e (3) expressão gênica.

RESULTADOS

Estudos selecionados

Os três artigos incluídos nesta revisão sistemática são ensaios clínicos controlados que adotaram como grupo de intervenção crianças com diagnóstico de TEA. Os grupos de controle incluem as crianças sem TEA, com ou sem outros distúrbios neurológicos a depender do estudo. Todos os pacientes tiveram amostras séricas colhidas e analisadas para pesquisa de metais pesados. As faixas etárias estudadas diferiram em cada estudo, numa faixa geral de 1-16 anos. As características individuais dos estudos estão expressas na tabela abaixo.

Tabela 2 - Características dos estudos selecionados.

Bibliografia	Macedoni-Lukšič et al (2014)	Hodgson et al. (2014)	Tian Y (2009)
Desenho de estudo	Ensaio clínico controlado.	Ensaio clínico controlado.	Ensaio clínico controlado.
Objetivo	Comparar os níveis séricos de metais pesados e porfirinas na urina de crianças com TEA e crianças com outros distúrbios neurológicos.	Quantificar estresse oxidativo e metabolismo do mercúrio através de controles séricos em crianças com e sem TEA.	Correlacionar os níveis sanguíneos de expressão gênica de chumbo em crianças com e sem TEA.
Metal avaliado	Alumínio, chumbo, cobre, mercúrio e zinco.	Mercúrio.	Chumbo.
N grupo TEA	52	27	37
N grupo controle	22	27	15
Idade	1-16 anos.	3-5 anos.	2-5 anos.
Conclusão	Foi determinada elevada razão sérica cobre/zinco nas crianças com TEA em relação ao grupo controle. Não foram encontradas diferenças relativas aos outros metais avaliados.	Aumento do estresse oxidativo, diminuição do metabolismo do mercúrio e aumento da concentração de mercúrio no fio de cabelo em crianças com TEA.	Não foi determinada diferença significativa nos níveis séricos de chumbo entre os grupos avaliados.
Análise estatística	MANCOVA	ANOVA	ANCOVA

Avaliação da qualidade dos artigos

Para o julgamento da qualidade dos ensaios clínicos randomizados incluídos foi utilizado como base o checklist proposto pelo National Collaborating Centre for Mental Health (UK)²⁰, com as modificações adequadas a este trabalho. Foi utilizado como parâmetro também a escala de Jadad²¹. Essas informações podem ser observadas na tabela 3.

Tabela 3 - Qualidade dos ensaios clínicos incluídos na Revisão Sistemática.

Bibliografia	Macedoni-Lukšič et al (2014)	Hodgson et al. (2014)	Tian Y (2009)
Questão clínica focada e apropriada	Sim	Sim	Sim
Ensaio clínico controlado	Sim	Sim	Sim
Randomização	Sim	Sim	Sim
Desfechos por avaliação de metais pesados	Sim	Sim	Sim
Minimização de vieses	Sim	Sim	Sim
Violação do código de ética	Não	Não	Não
Pontuação na Escala de Jadad	2	2	2

Características individuais dos estudos

No ensaio clínico realizado por Macedoni-Lukšič et al (2014)²² foram selecionados 74 pacientes para o estudo. Todos os participantes eram crianças, na faixa etária de 1 a 16 anos, e foram alocados em dois grupos. O grupo de intervenção (52 pacientes, idade média $6,2 \pm 3$ anos) era composto por pacientes com TEA, cujo diagnóstico foi baseado no DSM-IV (Texto Revisado) e estavam em tratamento no Children's Hospital Ljubljana. O grupo controle (22 pacientes, idade média $6,6 \pm 3,7$ anos) continha crianças com outras desordens neurológicas, dentre elas: síndrome de Tourette, epilepsia, atraso de desenvolvimento, transtorno de déficit de atenção e outras.

Macedoni-Lukšič et al.²² avaliou habilidades cognitivas, de acordo com a idade, baseado nas escalas de Bayley Scales of Infant Development (BSID-II) - Mental Scale, Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC-III) e Raven's Colour Progressive Matrices (CPM). Além disso, utilizou-se das seguintes técnicas para avaliação de desfechos:

- a) Análise de Zinco (Zn) e Cobre (Cu) por espectrometria de absorção atômica com chama;
- b) Análise de Alumínio (Al) e Chumbo (Pb) pelo sistema atômico método de espectrometria de absorção;
- c) Análise de Mercúrio (Hg) pelo método de espectrometria de absorção atômica por vapor frio;
- d) Análise de porfirinas por cromatografia líquida de alta eficiência.

Hodgson et al. (2014)²³ conduziu um estudo controlado com 54 crianças, sendo metade do grupo de intervenção (crianças com TEA) e metade do grupo controle (crianças sem TEA). Neste último, excluíram-se os participantes com distúrbios comportamentais e desordens neurológicas. A faixa etária do estudo foi de 3 a 5 anos.

O metal analisado neste trabalho foi o mercúrio, dosado em amostras de cabelo de ambos os grupos para posterior comparação entre eles. Este desfecho foi analisado por espectrometria de massa acoplada indutivamente (ICPMS) e a precisão da metodologia do ICPMS foi verificada pelo uso apropriado de ensaio em branco. Além disso, elementos séricos envolvidos no metabolismo do estresse oxidativo também foram observados e pontuados a partir de:

- a) Tióis séricos, medidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e detecção eletroquímica;
- b) N-homocisteinilização das proteínas selecionadas, calculado a partir da intensidade de quimioluminescência.

Por sua vez, Tian Y (2009)²⁴ reuniu 52 pacientes na faixa etária de 2 a 5 anos, dividindo-os em crianças com TEA (grupo de intervenção) e crianças da população geral (grupo controle).

Neste estudo, chumbo foi avaliado a partir de amostras de sangue, coletadas de ambos os grupos em tubos vacutainer com ácido etilenodiaminitetraacético (EDTA). Além de buscar estabelecer uma relação entre a expressão de genes e as amostras de chumbo obtidas através de isolamento de RNA e processamento de microarray, permitindo a comparação quantitativa dos grupos em estudo.

Avaliação estatística

Macedoni-Lukšič et al.²² comparou os grupos por idade a partir de t-test, seguido da avaliação por gênero e comorbidades a partir de χ^2 test, Fisher's exact test e Mann-Whitney U test.

Para o cálculo das diferenças de concentração de metais pesados e porfirinas urinárias em cada um dos grupos, foi utilizado do método MANCOVA, seguido de Spearman para avaliação da correlação entre parâmetros bioquímicos e o nível de habilidades cognitivas gerais. O nível de erro α aceitável para todas as análises estatísticas realizadas foi de 0,05 (p), tornando o estudo em questão significativo.

Em Hodgson et al.²³ o grupo de TEA foi avaliado em comparação com dados do grupo de controle, a partir do agrupamento de individualidades com gênero e idade. Os dados agrupados foram inicialmente avaliados por ANOVA, seguida de análise Post Hoc para metabolitos individuais utilizando o Student's t-test para avaliar a significância com um ponto de corte $P < 0,05$.

Foi realizada análise de covariância, a dada por ANCOVA, no ensaio Tian, 2009²⁴ e as correlações parciais foram estimadas entre expressão gênica e níveis de chumbo transformados por log2, enquanto os efeitos de idade e sexo foram controlados. A fim de reduzir falsos positivos, apenas resultados que se sobrepunham a três modelos de ANCOVA foram considerados.

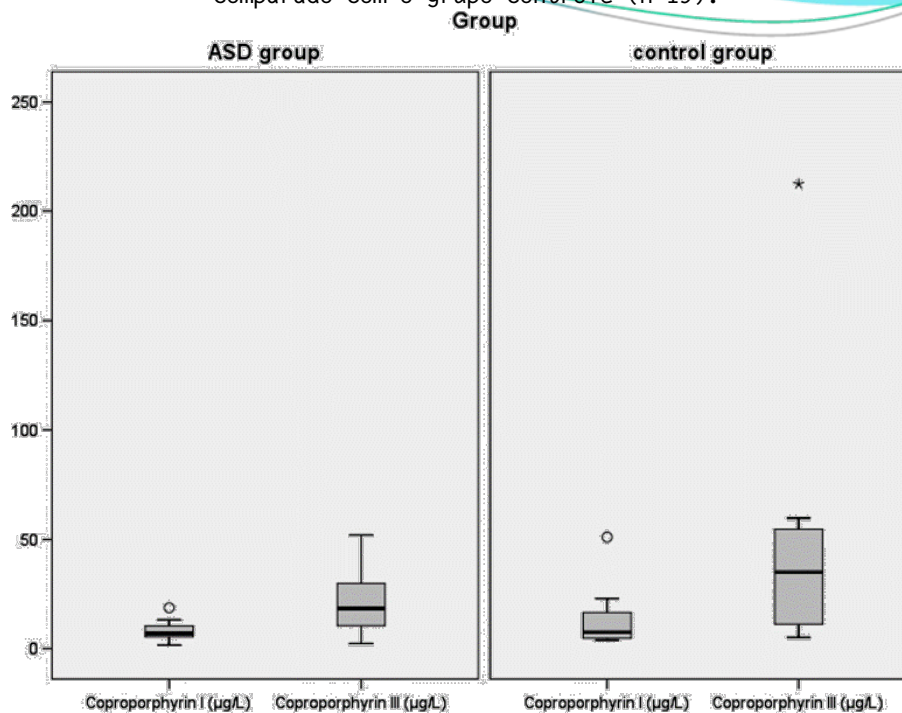
Expressão de metais pesados no quadro do TEA

Os três estudos possuíam como objetivo comum comparar as concentrações orgânicas de metais pesados entre o grupo com TEA e o grupo controle, de modo a avaliar posteriormente sua interferência no quadro da doença em questão. Os resultados de cada estudo estão apresentados na tabela 4 e se referem aos valores encontrados na dosagem de metais pesados, sendo este desfecho primário. Além disso, foram explicitados os desfechos secundários.

Tabela 4 - Avaliação dos desfechos primários e secundários.

Referência	Desfecho avaliado	Grupo TEA	Grupo controle
Macedoni-Lukšič et al (2014)	Metal pesado dosado (Média ± SD)		
	Cobre ($\mu\text{mol/L}$)	20.57 ± 3.29	19.87 ± 4.12
	Alumínio ($\mu\text{g/L}$)	7.05 ± 6.27	8.06 ± 9.86
	Zinco ($\mu\text{mol/L}$)	10.74 ± 1.81	12.10 ± 1.52
	Chumbo ($\mu\text{g/L}$)	30.80 ± 34.33	18.60 ± 7.24
	Mercúrio (mg/L)	1.90 ± 0.97	1.55 ± 0.56
	Porfirinas urinárias (Gráfico 1)	<	>
Hodgson et al. (2014)	Metal pesado dosado (Média ± SD)		
	Mercúrio ($\mu\text{g/g}$)	6.93 ± 0.36	0.611 ± 0.033
	Stress oxidativo (%)		
	Glutaciona (GSH)	29%	100%
	Hemocisteína (HCY)	100%	59%
Tian Y (2009)	Metal pesado dosado (Média ± SD)		
	Chumbo ($\mu\text{g/dL}$)	1.30 ± 1.01	1.30 ± 0.58
	Expressão gênica (probe sets)	1589	843

Gráfico 1: Concentrações da Coproporfirinas I e III ($\mu\text{g/L}$) na urina de crianças com TEA (n=18) comparado com o grupo controle (n=19).



Apenas Hodgson et al.²³ demonstrou uma diferença significativa entre os grupos para o desfecho primário, no qual se evidenciou valores elevados de mercúrio nas amostras de cabelo de pacientes com TEA. Em Macedoni-Lukšič et al²² e Tian Y²⁴ as diferenças foram discretas.

No entanto, no que diz respeito aos desfechos secundários, cada um dos estudos trouxe parâmetros importantes que se mostraram bem diferenciados entre os grupos. Em Macedoni-Lukšič et al²², as porfirinas urinárias mostraram-se diminuídas enquanto a relação Cu/Zn foi elevada. Hodgson et al²³ demonstrou diferença em critérios relacionados ao estresse oxidativo, aumentado no grupo com TEA. Já Tian Y²⁴ evidenciou a relevante participação da expressão gênica relacionada ao chumbo.

DISCUSSÃO

O TEA é um distúrbio de neurodesenvolvimento, com participação inflamatória e autoimune. As manifestações neurológicas são proeminentes e pode-se incluir ainda sintomas gastrointestinais e condições sistêmicas. Para tal quadro, considera-se o envolvimento de metais pesados em sua expressão, avaliando outras possíveis relações como porfirinas urinárias, estresse oxidativo e expressão gênica.

Em Macedoni-Lukšič et al²² não foram encontradas diferenças estatísticas significantes nos níveis séricos dos metais avaliados entre o grupo de crianças com TEA e crianças com outros transtornos neurológicos. MANCOVA não confirmou correlação de grupo, idade ou gênero para a concentração sérica de metais pesados.

As porfirinas foram objeto de estudo em cada grupo, visto que sua presença na urina pode ser um indicador de intoxicação por metais pesados. Evidências na literatura mostram valores aumentados em crianças com TEA, se comparadas a crianças sem o transtorno²⁵. No entanto, a análise multivariada de covariância do estado mostrou correlação estatística entre a menor concentração de coproporfirina I e III e a presença de TEA. Todavia, deve-se destacar que no estudo em questão o grupo controle era composto por crianças com outros distúrbios neurológicos.

Ainda neste estudo, houve uma relação de Cu / Zn significativamente elevada, principalmente como resultado de diferenças no nível de Zn. Esta pode ser explicada

pela tendência à redução da atividade do mecanismo de desintoxicação da metalotioneína e/ou Cu/Zn SOD1, resultando em estresse oxidativo excessivo e danos às células do sistema nervoso. O estudo conclui que a dosagem de Cu e Zn é interessante em toda criança paciente de TEA para recomendação positiva a suplementação de Zn, no caso de sua insuficiência.

Alterações induzidas pelo estresse oxidativo na metilação do DNA podem contribuir para o comprometimento do neurodesenvolvimento no autismo²⁶. Os achados de Hodgson et al²³ refletem uma capacidade comprometida de desintoxicar e excretar o mercúrio derivado de alimentos em crianças com TEA, além da significativa elevação nos níveis de mercúrio e outros metais pesados em amostras de cabelo destes pacientes.

Essa relação é de ainda mais importância em Oman, população estudada, em que o consumo de peixe (principal fonte de mercúrio alimentar) é maior do que a média global. A GSH liga-se e contribui para a desintoxicação do mercúrio, corroborando para o achado desta reduzida em crianças com TEA, enquanto a depleção de tiol pode aumentar a oportunidade de o mercúrio exercer seus efeitos neurotóxicos.

Como resultado de Tian Y²⁴, apesar das diferenças não significativas nos níveis séricos de chumbo entre crianças com TEA e controle, notou-se categórica predominância dos genes cuja expressão se correlaciona com os níveis de chumbo em crianças com TEA diferente daqueles que se correlacionam com os níveis de chumbo em crianças do grupo controle. Ou seja, a expressão gênica assume papel determinante para concentração e comportamento do metal pesado no organismo.

A descoberta de que existem correlações entre a expressão de centenas de genes no sangue e os níveis de chumbo no sangue em ambos os grupos apoia a noção de que níveis crescentes de chumbo, mesmo em níveis baixos, estão associados a diferenças de transcrição no sangue. Assim, mesmo baixos níveis de chumbo podem produzir efeitos biológicos em humanos. Se estas são respostas toxicológicas ou respostas adaptativas / protetoras podem depender do contexto ambiental e do contexto genético em que elas ocorrem.

A disparidade dos métodos de avaliação dos metais utilizados entre os estudos selecionados nesta revisão, associada ao reduzido número de trabalhos obtidos, prejudicam a análise e a consolidação dos resultados. Desta forma, fazem-se necessários novos estudos na área, tendo em vista a padronização das análises dos metais e o aprofundamento da maneira como eles interagem com o TEA.

Proposta de seguimento

Dada a importância do tema elencado neste trabalho e a falta de estudos que explicitem claramente a relação dos metais pesados com o TEA, pode-se levantar questões adicionais a serem exploradas posteriormente, incluindo possíveis considerações para elaboração de um novo estudo.

Sabe-se que o DSM-5 dispõe de uma série de critérios para estabelecer o diagnóstico, citados anteriormente. No entanto, no quesito identificação precoce, os métodos de triagem ganham destaque.

O M-CHAT-R/F tem como objetivo maximizar a sensibilidade, ou seja, detectar o maior número possível de casos de TEA em uma população. Isso não significa que todas as crianças que obtêm uma pontuação de risco serão diagnosticadas com TEA, pois a sensibilidade do teste pressupõe uma elevada taxa de falsos positivos. Entretanto, um número significativo de crianças que pontuam positivo no M-CHAT-R/F podem apresentar risco elevado para outros distúrbios do desenvolvimento ou atrasos sendo, portanto, justificada a avaliação e seguimento para qualquer criança que venha a ter resultados positivos na triagem.⁶

Considerando-se a mais recente revisão do MCHAT e a evidente importância para triagem das crianças com TEA, de encontro aos dados sistematicamente analisados neste

trabalho, pode-se propor um novo estudo que correlacionasse a pontuação no MCHAT-R/F com a dosagem de metais pesados nos pacientes triados, visando estabelecer uma possível relação prognóstica.

Numa população pediátrica delimitada, aplicar-se-ia o MCHAT-R/F como instrumento de triagem e, posteriormente, os pacientes com pontuações positivas seriam avaliados para dosagem sérica de metais. Dessa forma, seria possível analisar se as concentrações orgânicas precoces dos mesmos influenciam na forma de apresentação da doença e na pontuação da triagem.

CONCLUSÃO

Os três estudos selecionados para esta revisão corroboram com a hipótese da metabolização inapropriada de metais pesados em pacientes com TEA. A concentração orgânica destas toxinas manifesta-se como um possível contribuinte para a etiologia multifatorial do transtorno.

Além disso, esta revisão evidencia outras relevantes maneiras de avaliação indireta dos níveis de metais, não somente a dosagem sérica de cada um, possibilitando uma pesquisa ampliada e explicitando que essa relação pode ocorrer de diversas formas.

Dessa forma, são necessários novos trabalhos para elucidar mais precisamente a relação entre o TEA e a expressão dos metais pesados, que tem se tornado cada vez mais relevante nos cenários brasileiro e mundial nos últimos anos.

REFERÊNCIAS

- 1 - Baio J, Wiggins L, Christensen DL, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ* 2018;67(No. SS-6):1-23. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>. Acesso em: 10/02/2019.
- 2 - Maskey, Morag & Warnell, Frances & R Parr, Jeremy & Couteur, Ann & McConachie, Helen.. Emotional and Behavioural Problems in Children with Autism Spectrum Disorder. *Journal of autism and developmental disorders*. (2012).43. 10.1007/s10803-012-1622-9.
- 3 - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al. DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Artmed Editora, 2014. Seção 2. P 50-59.
- 4 - JAMA psychiatry MAENNER, Matthew J. et al. Potential impact of DSM-5 criteria on autism spectrum disorder prevalence estimates. *JAMA psychiatry*, v. 71, n. 3, p. 292-300, 2014.
- 5 - Jamie M. Kleinman, corresponding author Diana L. Robins, Pamela E. Ventola, Juhi Pandey, Hilary C. Boorstein, Emma L. Esser, et al. The Modified Checklist for Autism in Toddlers: A Follow-up Study Investigating the Early Detection of Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*. 2008 May; 38(5): 827-839. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3612529/>. Acesso em: 12/02/2019.
- 6 - Site MChatscreen.com. M-CHAT™ Diana L. Robins, Ph.D. <https://mchatscreen.com/mchat-rf/translations/>. Acesso: 12/02/2019.
- 7 - TROTTIER, Genevieve; SRIVASTAVA, Lalit; WALKER, Claire-Dominique. Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic and neurobiological research. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v. 24, n. 2, p. 103, 1999.
- 8 - BÖLTE, Sven; GIRDLER, Sonya; MARSCHIK, Peter B. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cellular and Molecular Life Sciences*, p. 1-23, 2018.

- 9 - STEFFENBURG, Suzanne. Neuropsychiatric Assessment of Children with Autism: A Population-Based Study. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v. 33, n. 6, p. 495-511, 1991.
- 10 - EMBERTI GIALLORETI, Leonardo et al. Risk and Protective Environmental Factors Associated with Autism Spectrum Disorder: Evidence-Based Principles and Recommendations. *Journal of clinical medicine*, v. 8, n. 2, p. 217, 2019.
- 11 - CONSTANTINO, John N.; TODD, Richard D. Autistic traits in the general population: a twin study. *Archives of general psychiatry*, v. 60, n. 5, p. 524-530, 2003.
- 12 - SAGHAZADEH, Amene; REZAEI, Nima. Systematic review and meta-analysis links autism and toxic metals and highlights the impact of country development status: Higher blood and erythrocyte levels for mercury and lead, and higher hair antimony, cadmium, lead, and mercury. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 79, p. 340-368, 2017.
- 13 - SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo, 1996. cap. 3.2, p. 154-172.
- 14 - McEvoy G. *AHFS Drug Information*. Bethesda, Maryland, USA: American Society of HealthSystem Pharmacists; 2011.
- 15 - Sakamoto M, Nakamura M, Murata K. Mercury as a Global Pollutant and Mercury Exposure Assessment and Health Effects. *Nihon Eiseigaku Zasshi*. 2018;73(3):258-264. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30270289>. Acesso em 06/02/2019.
- 16 - Modabbernia A, Velthorst E, Reichenberg A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism*. 2017 17;8:13.
- 17 - Vojdani A, Mumper E, Granpeesheh D, Mielke L, Traver D, Bock K, et al. Low natural killer cell cytotoxic activity in autism: the role of glutathione, IL-2 and IL-15. *J Neuroimmunol*. 2008; 205(1-2):148-54. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18929414>. Acesso em 06/02/2019.
- 18 - Aschner M. The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB J*. 1996; 10(10):1129-36. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8751715>. Acesso em 06/02/2019
- 19 - Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 2005;57(1):67-81. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546155>. Acesso em 06/02/2019.
- 20 - National Collaborating Centre for Mental Health (UK). *Drug Misuse: Psychosocial Interventions*. Leicester (UK): British Psychological Society; 2008. (NICE Clinical Guidelines, No. 51. Appendix 9, Quality checklists for clinical studies and studies and reviews. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53205/>. Acesso em 13/02/2019.
- 21 - Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials*. 1996 Feb;17(1):1-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721797>. Acesso em: 13/02/2019.
- 22 - Macedoni-Lukšič M, Gosar D, Bjørklund G, Oražem J, Kodrič J, Lešnik-Musek P et al. Levels of metals in the blood and specific porphyrins in the urine in children with autism spectrum disorders. *Biol Trace Elem Res*. 2015 Feb;163(1-2):2-10.

- 23 - Hodgson NW, Waly MI, Al-Farsi YM, Al-Sharbati MM, Al-Farsi O, Ali A, et al. Decreased glutathione and elevated hair mercury levels are associated with nutritional deficiency-based autism in Oman. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014 Jun; 239(6):697-706.
- 24 - Tian Y1, Green PG, Stamova B, Hertz-Picciotto I, Pessah IN, Hansen R et al. Correlations of gene expression with blood lead levels in children with autism compared to typically developing controls. *Neurotox Res*. 2011 Jan;19(1):1-13. Epub 2009 Nov 17.
- 25 - Geier DA, Geier MR (2006) A prospective assesement of porphyrins in autistic disorders: a potential marker for heavy metal exposure. *Neurotox Res* 10:57-64.
- 26 - Muratore CR, Hodgson NW, Trivedi MS, Abdolmaleky HM, Persico AM, Lintas C et al. Age-dependent decrease and alternative splicing of methionine synthase mRNA in human cerebral cortex and an accelerated decrease in autism. *PLoS One* 2013;8:e56927. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23437274>. Acesso em: 20/02/2019.