

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos

Dissertação



Contagem de monócitos elevada em crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro do Autismo: influência do excesso de peso e do comportamento alimentar.

Bárbara Peter Gonçalves

Pelotas, 2021

Bárbara Peter Gonçalves

Contagem de monócitos elevada em crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro do Autismo: influência do excesso de peso e do comportamento alimentar.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Sandra Costa Valle

Co-Orientadora: Juliana dos Santos Vaz

Pelotas, 2021

Bárbara Peter Gonçalves

Contagem de monócitos elevada em crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro do Autismo: influência do excesso de peso e do comportamento alimentar.

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12/11/2021

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sandra Costa Valle (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Fisiologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Profa. Dra. Juliana dos Santos Vaz (Coorientadora)
Doutora em Epidemiologia Nutricional pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Cecília Fernandes Lorea
Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Dra. Kamila Castro Grokoski
Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Profa. Dra. Romina Buffarini
Doutora em Epidemiologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho a minha mãe que não mediu esforços para a concretização deste sonho e à minha filha, minha razão de viver e maior motivação. Que a dedicação a este trabalho lhe sirva de incentivo a realizar todos os teus sonhos.

Agradecimentos

O presente estudo é um trabalho desenvolvido com esforço e dedicação, o qual só foi possível concretizar com a ajuda e o apoio dispensado por várias pessoas que para ele contribuíram direta ou indiretamente e para as quais vai o meu sincero reconhecimento.

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, por guiar minha trajetória e por sua bondade em me agraciar com tantas oportunidades, mesmo quando nem mesmo eu acreditava em mim, Ele me deu forças e sabedoria para seguir em frente na realização do meu objetivo.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação, em especial à minha mãe que não mediu esforços para me proporcionar estudo, por me mostrar a importância da educação, e o quanto ela nos modifica, não apenas a vida profissional como também o olhar ao meio em que vivemos. Obrigada mãe por sempre me encorajar a seguir em frente e conquistar meus sonhos. Esta conquista é tão minha quanto tua! Gratidão a minha irmã, que sempre dedicou-se a mim como uma mãe e sempre esteve ao meu lado, mesmo quando eu não conseguia ver, me apoiando e zelando.

A minha filha Helena, por sua luz clarear meus dias, por seu amor preencher meu coração, por ser a motivação da minha vida, e por me acompanhar nessa caminhada, compreendendo meus momentos ausentes, muitas vezes escondida para conseguir trabalhar, por respeitar quando dizia “filha a mamãe está em reunião”, “agora vou atender um paciente”, “a mamãe vai escrever só mais um pouquinho e já vamos brincar”. Vários dias chorei quando não conseguia estar contigo brincando e fazendo suas atividades, mas foi pensando no nosso futuro, na nossa vida juntinhas que tive forças para chegar até aqui, essa conquista é para você filha!

A toda minha família, primas, afilhadas e tios por compreenderem minha ausência e me apoiarem sempre, com palavras de afeto e motivação.

As minhas amigas, mães mestras terem sido suporte nos dias difíceis, pela paciência e colaboração, pelo chimarrão com alecrim carregado de afeto, pelo empréstimo de suas casas silenciosas para os estudos, pela disponibilidade de um

tempinho para ser ombro amigo, por me fortalecerem, por compartilharem seus anseios que muitas vezes eram o mesmo: a sobrecarga da mãe, estudante, trabalhadora, mulher... Mais do que nunca a frase “Ninguém larga a mão de ninguém” fez tanto sentido.

As minhas irmãs colegas da nutrição por compartilharem comigo suas vidas há aproximadamente 10 anos, pelo apoio incondicional sempre, pelo suporte nos dias difíceis, por partilharem o conhecimento das “palavrinhas mágicas” no Stata, disponibilidade de aulas particulares até tarde da noite, por abrirem um tempinho em suas agendas para um almoço, café, uma viagem, sempre recheados de risadas, cumplicidade e muito carinho.

Ao meu namorado Lu, pelo apoio, compreensão com meu tempo corrido, pelo carinho de sua companhia nas madrugadas de trabalho, pelo seu amor, incentivo e entusiasmo que faz me sentir segura, confiante e amada.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Sandra, meu agradecimento pela sua dedicação, incentivo e carinho ao transmitir seus ensinamentos. Gratidão, por sempre me estimular a pesquisa, incentivando minha autonomia e por confiar no meu trabalho. Tenho uma enorme admiração por você.

A minha co-orientadora Prof.^a Dra. Juliana, agradeço pela sua disponibilidade na elaboração deste trabalho.

A equipe PANA, pelo compartilhamento de experiências, conhecimentos, e parcerias, a participação de vocês tornou todo o processo de pesquisa mais agradável. Em especial, agradeço a colega de projeto Eduarda pela compreensão, dedicação e suporte nestes dois anos de estudo, mas principalmente agradeço pela amizade e parceria que construímos, não sei o que seria de mim sem você!

Aos meus pacientes do PANA e seus familiares por confiarem no meu trabalho e me darem a oportunidade de adentrar em suas vidas.

As Doutorandas Mayra e Thays que sempre em meio a suas ocupações arranjavam tempo para poder auxiliar nas dúvidas da parte estatística do trabalho. A colega Josi Luçardo que sempre se manteve disposta a auxiliar no esclarecimento de dúvidas sobre o funcionamento e metodologia do projeto PANA.

A todos os professores da minha trajetória acadêmica por contribuírem com seus conhecimentos e experiências.

Enfim, a todos os demais que não foram citados, mas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
(Madre Teresa de Calcutá)

Gonçalves, Bárbara Peter. **Contagem de monócitos elevada em crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro do Autismo: influência do excesso de peso e do comportamento alimentar.** Orientadora: Sandra Costa Valle. 2021. N pag.108. Dissertação, Faculdade de Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

A disfunção imunológica, a inflamação e a interação entre estes fatores tem sido relacionadas tanto à etiologia quanto à gravidade dos sintomas no Transtorno do Espectro do Autismo (TEA). Sabe-se que o excesso de peso é um fator independente associado a disfunção imunológica, sendo encontrado em elevadas prevalências no TEA, em especial naqueles que tendem a se alimentar para lidar com diferentes estados emocionais. Uma das vias de investigação do sistema imunológico é a análise das células sanguíneas da série branca, especialmente dos monócitos. O objetivo deste estudo foi investigar o número de monócitos e sua associação o excesso de peso em crianças e adolescentes com TEA. Estudo transversal realizado de outubro de 2018 a março de 2020, no Núcleo de Neurodesenvolvimento da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. Foram incluídos 68 pacientes com diagnóstico de TEA, entre 3 e 18 anos, sem diagnóstico de síndrome genética, neuropatia e cardiopatia congênita, alergia, neoplasia ou infecção. O desfecho foi o número de monócitos (/mm³). Para isso, uma amostra de 5mL de sangue foi obtida em jejum e o hemograma analisado por impedância elétrica. A exposição principal foi o excesso de peso, considerado como IMC para idade >+1 escore-z. O comportamento alimentar, avaliado com a escala *Children's Eating Behaviour Questionnaire* (CEBQ) foi utilizado para descrever a amostra e como fator de ajuste. A distribuição da variável de desfecho foi simétrica e a comparação entre duas ou mais categorias de variáveis de exposição foi realizada com teste t de Student ou One Way ANOVA, respectivamente. Utilizou-se regressão linear para avaliar a associação entre o número de monócitos e o excesso de peso (IMC <1 ez), ajustado para variáveis com p< 0,05. O fator de ajuste mantido nesta análise foi a classificação acima ou abaixo da média de pontuação na subescala “sobre ingestão emocional. O nível de significância estatística foi p< 0,05. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, sob protocolo nº 2.835.793. Os participantes do estudo tinham em média 8,6 ± 3,3 anos de idade, a maioria era do sexo masculino (79%), utilizava fármaco antipsicótico (62%) e tinha excesso de peso (66%). O número de monócitos foi maior naqueles com excesso de peso (522±211 /mm³) comparados aos sem excesso de peso (394±142 / mm³) e naqueles com pontuação acima da média na subescala “sobre ingestão emocional” (581±247 vs 452±126) comparados aos abaixo da média. Na análise de regressão o aumento de monócitos associado ao excesso de peso manteve-se significativo após ajuste para “sobre ingestão emocional”. Crianças e adolescentes com TEA apresentaram elevação da contagem de monócitos associada ao excesso de peso e a maior “sobre ingestão emocional”. Uma intervenção nutricional para controle do peso e da qualidade nutricional da dieta pode mitigar o impacto negativo sobre a atividade inflamatória e a disfunção imunológica nestes pacientes.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista. Células sanguíneas brancas. Monócitos. Excesso de peso. Comportamento alimentar.

Gonçalves, Bárbara Peter. **Elevated monocyte counts in children and adolescents with Autism Spectrum Disorder: influence of overweight and eating behavior.** Advisor: Sandra Costa Valle. 2021. N pag.108. Dissertation, School of Nutrition, Graduate Program in Nutrition and Food, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Immune dysfunction, inflammation, and the interaction between these factors have been related to both the etiology and severity of symptoms in Autism Spectrum Disorder (ASD). Overweight is known to be an independent factor associated with immune dysfunction, and is found in high prevalences in ASD, especially in those who tend to eat to cope with different emotional states. One of the avenues of investigation of the immune system is the analysis of white series blood cells, especially monocytes. The aim of this study was to investigate the number of monocytes and their association with overweight in children and adolescents with ASD. A cross-sectional study conducted from October 2018 to March 2020, at the Neurodevelopmental Center of the Faculty of Medicine, Federal University of Pelotas, Pelotas-RS. Sixty-eight patients diagnosed with ASD, between 3 and 18 years old, without diagnosis of genetic syndrome, neuropathy and congenital heart disease, allergy, neoplasia, or infection were included. The endpoint was the number of monocytes (/mm³). For this a 5mL blood sample was obtained fasting and the CBC was analyzed by electrical impedance. The primary exposure was overweight, considered as BMI>+1 z-score. Eating behavior, assessed with the Children's Eating Behaviour Questionnaire (CEBQ) scale, was used to describe the sample and as an adjustment factor. The distribution of the outcome variable was symmetrical and the comparison between two or more categories of exposure variables was performed with Student's t test or One Way ANOVA, respectively. Linear regression was used to assess the association between monocyte number and overweight (BMI <1 ez), adjusted for variables with p< 0.05. The adjustment factor retained in this analysis was the classification above or below the mean score on the subscale "emotional overeating". The level of statistical significance was p< 0.05. The project was approved by the Research Ethics Committee of the institution, under protocol number 2.835.793. The study participants were on average 8.6 ± 3.3 years old, most were male (79%), used antipsychotic drug (62%) and overweight (66%). The number of monocytes was higher in those who were overweight (522±211 /mm³) compared to those who were not overweight (394±142 /mm³) and in those who scored above average on the "emotional overeating" subscale (581±247 vs 452±126) compared to those below average. In regression analysis the increase in monocytes associated with overweight remained significant after adjusting for "emotional overeating". Children and adolescents with ASD showed elevated monocyte counts associated with overweight and greater "emotional overeating." A nutritional intervention to control weight and nutritional quality of the diet may mitigate the negative impact on inflammatory activity and immune dysfunction in these patients.

Keywords: Autistic spectrum disorder. White blood cells. Monocytes. Overweight. Eating behavior.

Lista de Figuras

Parte 1 – Projeto de pesquisa

Figura 1.	Origem e desenvolvimento das linhagens das células sanguíneas..	29
Figura 2.	Quadro da descrição das buscas pelos artigos nas bases de dados para o quadro de revisão.....	36
Figura 3.	Quadro com o resumo dos principais trabalhos encontrados sobre autismo e contagem de células sanguíneas.....	44
Figura 4	Fluxograma do estudo PANA.....	50
Figura 5.	Explicação das subescalas utilizadas no <i>Children’s Eating Behaviour Questionnaire</i> (CEBQ)	53
Figura 6.	Quadro do orçamento.....	54
Figura 7.	Quadro do cronograma de execução do projeto de pesquisa.....	55

Parte 3 – Manuscrito

Figura 1.	Relação entre o número de monócitos e o excesso de peso em crianças e adolescentes com TEA.....	106
------------------	---	-----

Lista de Tabelas

Parte 1- Projeto de Pesquisa

Tabela 1.	Valores de referência das células sanguíneas da série branca para crianças a partir de 2 anos de idade.....	51
-----------	---	----

Parte 3- Manuscrito

Tabela 1.	Contagem absoluta de monócitos segundo características sociodemográficas, uso de antipsicótico e estado nutricional de crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo.....	102
Tabela 2.	Contagem absoluta de monócitos segundo a pontuação nos subdomínios da escala CEBQ ¹ em crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo.....	104
Tabela 3.	Regressão linear do número de monócitos e o estado nutricional de crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo.....	105
Tabela Suplementar 1	Característica do leucograma conforme a categoria de faixa etária, de crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo.....	107

Lista de abreviaturas e siglas

ADDM	<i>Autism and developmental disabilities monitoring network surveillance</i>
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
CEBQ	<i>Children's eating behaviour Questionnaire</i>
CTL	Contagem total linfócitos
DSM	<i>Diagnostic and statistical manual of mental disorders</i>
DP	Desvio padrão
DT	Desenvolvimento típico
EZ	Escore Z
FAMED	Faculdade de Medicina
IMC	Índice de massa corporal
mL	Mililitro
mm ³	Milímetros cúbicos
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização mundial da saúde
PANA	Protocolo de Atendimento Nutricional a indivíduos com transtorno do espectro Autista
RDW	Red cell distribution width
RML	Razão monócitos linfócitos
RNL	Razão neutrófilos linfócitos
RPL	Razão plaquetas linfócitos
R24H	Recordatório alimentar de 24 horas
SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas

Lista de Símbolos

$<$ Menor

$>$ Maior

\leq Menor igual

\geq Maior igual

\pm Mais ou menos

Sumário

Parte 1- Projeto de Pesquisa

1. Introdução.....	23
2. Referencial teórico.....	25
2.1 Transtorno Espectro Autista.....	25
2.2 Contagem de células sanguíneas da série branca.....	28
3. Revisão bibliográfica.....	35
3.1 Descrição da revisão da literatura.....	45
4. Justificativa.....	47
5. Objetivo.....	48
5.1 Objetivo geral.....	48
5.2 Objetivo específico.....	48
5.3 Hipóteses.....	48
6. Metodologia.....	49
6.1 Delineamento.....	49
6.2 Características do estudo.....	49
6.3 População e amostra.....	50
6.4 Critérios inclusão e exclusão.....	51
6.5 Variáveis.....	51
6.5.1 Variáveis dependentes.....	51
6.5.1.1 Contagem de células sanguíneas da série branca.....	51
6.5.1.2 Razão monócito/linfócito.....	52
6.5.1.3 Razão neutrófilo/linfócito.....	52
6.5.2 Variáveis independentes.....	52
6.5.2.1 <i>Children's Eating Behaviour Questionnaire</i> (CEBQ).....	52
6.5.2.2 Estado Nutricional.....	54
6.5.2.3 Variáveis sociodemográficas.....	54

6.5.3 Análise estatística.....	54
7.Orçamento.....	54
8. Cronograma.....	55
Referências.....	56
Apêndices.....	63
Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	64
Apêndice B – Questionário geral.....	65
Apêndice C – Voucher.....	71
Anexos	72
Anexo A - <i>Children’s Eating Behaviour Questionnaire</i> (CEBQ).....	73
Anexo B – Lista de checagem do questionário CEBQ.....	75
Parte 2- Relatório de campo.....	76
Parte 3- Manuscrito.....	83

Parte 1- Projeto de Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Projeto de Pesquisa

Células sanguíneas da série branca em crianças e adolescentes do espectro autista: proposta de estudo descritivo transversal.

Bárbara Peter Gonçalves

Pelotas, 2020

Bárbara Peter Gonçalves

Células sanguíneas da série branca em crianças e adolescentes do espectro autista: proposta de estudo descritivo transversal.

Projeto de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Costa Valle

Co-orientadora: Prof.^a Dra.^a Juliana dos Santos Vaz

Pelotas, 2020

Resumo

Introdução: O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por comprometimentos em dois domínios centrais: comunicação social; comportamento restritivo e repetitivo de interesses. Estima-se que o Brasil possua cerca de 2 milhões de autistas, os quais possuem um longo caminho até que encontrem o tratamento adequado. A etiologia do TEA envolve uma combinação de fatores genéticos, metabólicos e ambientais que ao se conectarem, tornam-se uma espécie de gatilho desencadeador do transtorno. Dentre os fatores etiológicos está a inflamação, a qual tem sido associada a alterações no sistema imunológico, tanto em nível sistêmico quanto celular. Uma das vias de investigação do estado inflamatório de um indivíduo é através da análise das células sanguíneas da série branca, os leucócitos. Essas células podem ser mensuradas por meio de hemograma, um exame de sangue de baixa complexidade, baixo custo, e frequentemente utilizado na prática clínica. Em crianças com TEA, tem sido descrita uma maior contagem de leucócitos, em especial das subpopulações neutrófilos, linfócitos e monócitos. Este efeito seria uma resposta celular ao maior nível de proteínas e toxinas inflamatórias observada nesses indivíduos. **Objetivo:** Investigar o número e a proporção de células sanguíneas da série branca e as razões monócito linfócito e neutrófilo linfócito, segundo características sociodemográficas, clínicas e comportamentais de crianças e adolescentes com TEA. **Métodos:** estudo transversal que será realizado com dados do estudo de intervenção intitulado: PANA “Protocolo de Atendimento Nutricional a indivíduos com transtorno do espectro Autista”. Foram convidados a participar do estudo pacientes com idade entre 3 a 18 anos e com ausência de neuropatias e cardiopatia congênita. Para o presente estudo serão utilizados dados de pacientes rastreados e incluídos no PANA no período entre outubro de 2018 a março de 2020. Amostras de sangue serão coletadas e analisadas em equipamento automático para determinação da contagem total do número de leucócitos e suas subpopulações e a razões monócito linfócito e neutrófilo linfócito. O comportamento alimentar será avaliado pelo Questionário do comportamento alimentar da criança CEBQ e o estado nutricional pelo escore z do Índice de Massa Corporal (IMC) para a idade. As variáveis idade em anos completos, sexo (feminino e masculino), cor da pele (branca, parda/mulata/morena/cabocla, negra, amarela/oriental, indígena), renda familiar (em reais), e uso de medicamentos serão obtidos através de um

questionário geral. **Resultados esperados:** espera-se que o número das células sanguíneas da série branca estará acima dos limites de referência, segundo a faixa etária. Ainda que uma maior RML será associada a obesidade, ao uso de fármacos psicoativos, a um comportamento mais irritado e a um menor nível de escolaridade materna. **Contribuições:** o estudo agregará conhecimento sobre a condição do sistema imunológico, avaliado por meio do número e das proporções das células sanguíneas da série branca, bem como das razões RML e RNL em crianças e adolescentes autistas. Além disso, o conhecimento gerado permitirá estratégias de tratamento, especialmente em âmbito nutricional, que propiciem a redução de agravos a saúde conforme o perfil de células identificado.

Palavras-chave: transtorno do espectro autista, células sanguíneas da série branca, razão monócitos linfócitos, razão neutrófilos linfócitos, comportamento.

1. Introdução

O transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento infantil, cujo diagnóstico é feito em torno dos três anos de idade e caracteriza-se por desvios na comunicação social e pela presença de padrões restritos e repetitivos de comportamento e interesses (DSM-5, 2013).

Segundo dados do *Center of Disease Control and Prevention* (CDC) existem 18,5 casos de autismo a cada 1.000 nascimentos, 1 para 54 (Maenner *et al.*, 2020). Houve aumento de 10% da prevalência comparando a anterior, que era 1 para 59 (Baio *et al.*, 2018; Maenner *et al.*, 2020). A razão de prevalência entre meninos e meninas é 4:1, entre crianças negras e brancas esta razão é similar. Contudo, as disparidades no diagnóstico e na intervenção precoce persistem para crianças negras (Maenner *et al.*, 2020). No Brasil ainda não há pesquisa de base populacional sobre a prevalência de TEA. Estima-se que o país tenha cerca de 2 milhões de pacientes com autismo, os quais possuem um longo caminho até que encontrem o tratamento adequado (Mello *et al.*, 2013).

A literatura indica que o TEA é causado por fatores genéticos, metabólicos e ambientais que ao se conectarem, tornam-se uma espécie de gatilho desencadeador do transtorno (Robinson *et al.*, 2015; Sociedade Brasileira de Pediatria, 2019; Maenner *et al.*, 2020). A influência genética é apoiada pela distribuição desigual entre o sexo, aumento da prevalência entre irmãos, alta concordância em gêmeos monozigóticos e o aumento do risco proporcional ao grau de parentesco (Robinson *et al.*, 2015). Entretanto, os fatores genéticos não atuam isolados e sofrem forte influência de fatores ambientais, como a idade avançada dos pais no momento da concepção, a exposição a fármacos durante o período pré-natal, infecções maternas durante a gestação e pós-natal na criança, parto prematuro, desequilíbrio na microbiota intestinal e nível socioeconômico (Depino, 2013; Bölte *et al.*, 2018).

Dentre os fatores envolvidos na etiologia do TEA está a inflamação, a qual tem sido associada a alterações no sistema imunológico, tanto em nível sistêmico quanto celular (Ashwood *et al.*, 2006, Depino, 2013). A inflamação afeta o sistema nervoso central (SNC) por meio do aumento do número de células do sistema imunológico e da liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias (Careaga *et al.*, 2017).

Uma das vias de investigação do estado inflamatório de um indivíduo é através da análise das células sanguíneas da série branca, os leucócitos. Essas células podem ser mensuradas por meio do leucograma, um exame de sangue de baixa complexidade, baixo custo, e frequentemente utilizado na prática clínica (Hesapcioglu *et al.*, 2017).

Em crianças com TEA, tem sido descrita uma maior contagem de leucócitos, em especial das subpopulações neutrófilos, linfócitos e monócitos, assim como das citocinas liberadas por estas células. Este efeito seria uma resposta celular ao maior nível de proteínas e toxinas inflamatórias observada nesses indivíduos (Sweeten *et al.*, 2003; Ashwood *et al.*, 2011; Hesapcioglu *et al.*, 2017; Kutlu and Cevher Binici, 2018; Kulaksizoglu and Koparan, 2019). Além disso, um maior grau de neuroinflamação foi associado a um maior déficit de socialização e cognição em crianças autistas (Onore *et al.*, 2012; Meltzer and Water, 2017; Careaga *et al.*, 2017).

2. Referencial teórico

2.1 Transtorno do Espectro do Autismo

O TEA é caracterizado por comprometimentos em dois domínios centrais: comunicação social; comportamento restritivo e repetitivo de interesses. Segundo o *Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5* (DSM- 5, 2013) algumas características são essenciais para diagnóstico do TEA e são classificadas em critérios: Critério A são prejuízos persistentes na comunicação social recíproca e na interação social, critério B são os padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades. Critério C se os sintomas estão presentes desde o início da infância e critério D se os sintomas limitam ou prejudicam o funcionamento diário do indivíduo. Estudos indicam que o DSM-5 permite o diagnóstico precoce e apresenta elevada especificidade, apesar disso, sua sensibilidade diagnóstica é baixa (Kulage *et al.*,2014; Mazurek *et al.*,2017).

O DSM-5 apresenta fragilidade no diagnóstico de TEA em pacientes do sexo feminino e com sintomas leves. Alley (2019) aponta que as meninas possuem um padrão de comportamento restrito e repetitivo de interesses diferente dos meninos, camuflando os sintomas. Ainda, Romero *et al.* (2016) consideram que as alterações realizadas na última versão do DSM, que tornaram necessário atender a todos os critérios relacionados aos domínios de interação e comunicação social, dificultam o diagnóstico de casos de TEA com grau leve, por exigirem maior severidade na sintomatologia para atender aos critérios diagnósticos.

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza o uso da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) como critério de diagnóstico do TEA, incluso no código F84 Transtorno global do desenvolvimento, subdividido nos códigos F84.0 autismo infantil, F84.1 autismo atípico.

O estágio em que o prejuízo funcional fica evidente irá variar de acordo com características do indivíduo e seu ambiente. Manifestações do transtorno também variam muito dependendo da gravidade, do nível de desenvolvimento e da idade cronológica, por isso o uso do termo espectro. Os sintomas do TEA frequentemente apresentam-se entre os 12 a 48 meses de idade, o diagnóstico é feito em torno dos 36 meses de idade (DSM-5, 2013).

A complexidade e a diversidade de apresentações clínicas do TEA são possivelmente devidas as interações entre vários genes e suas combinações, juntamente com as influências epigenéticas, ou seja, a exposição a modificadores ambientais que causam alteração na expressão gênica. Apesar da etiopatogenia

complexa acredita-se que vários elementos ou fatores ambientais possam contribuir (Bölte *et al.*, 2018).

As manifestações de autismo incluem deficiências em comunicação e interação social, comportamentos repetitivos, anormalidades sensoriais, e níveis variados de deficiência intelectual. As deficiências na comunicação e interação social envolvem principalmente três subdomínios: a reciprocidade social, comunicação não verbal e o desenvolvimento, manutenção e compreensão de relacionamentos. Os comportamentos e interesses repetitivos e restritos abrangem de dois a quatro dos seguintes subdomínios: comportamentos estereotipados e repetitivos, insistência na mesmice, interesses restritos e fixos (DSM-5, 2013).

Alterações sensoriais, como a hipersensibilidade ou hipossensibilidade (visão, audição, tato, propriocepção e gustação), com interesse ou restrição em informações sensoriais específicas também são sintomas considerados no diagnóstico do DSM-5. Podem estar presentes ou não no início do desenvolvimento, ou manifestar-se tardiamente (DSM-5, 2013), assim como possuem a janela temporal multissensorial, onde estas alterações podem estar aumentadas ou atenuadas, dependendo dos estímulos recebidos e da proximidade de tempo em que os eventos desencadeadores da alteração sensorial ocorreram (Siemann *et al.*, 2020). Essas disfunções multissensoriais desempenham um papel crítico na comunicação social, comportamentos e sintomas de deficiência intelectual assim como atraso global de desenvolvimento (Hilton *et al.*, 2010).

Estas modificações no processamento sensorial com hipo ou hipersensibilidade podem afetar seriamente o comportamento alimentar (Stevenson *et al.*, 2014). Estes fatores intrínsecos motivam a repulsa ou afinidade a determinadas texturas, sabores, cheiros e formatos. Em especial, experiências sensoriais prazerosas, geralmente ligadas a alimentos hiper palatáveis e nutricionalmente incompletos, que motivam as crianças a um consumo alimentar elevado (Zuckermann *et al.*, 2014). O elevado consumo de biscoitos e alimentos tipo “snacks”, hiper palatáveis, também foi relacionado a episódios de raiva, comportamento indisciplinado durante as refeições, recusa e solicitação e alimentos (Castro *et al.*, 2016). Estudos apontam que indivíduos com TEA têm o hábito de comer para lidar com diferentes estados emocionais de alegria, ansiedade e estresse, ingerindo frequentemente bebidas açucaradas ao longo do dia, além de comerem mais rapidamente, evidenciando episódios de compulsão alimentar (Castro *et al.*, 2016; Kamal Nor *et al.*, 2019).

Sharp e colaboradores (2013) em uma meta-análise, relataram que crianças com TEA tiveram mais problemas com alimentação quando comparados com seus pares, identificando seletividade alimentar nas crianças com TEA. A ingestão alimentar afetada por problemas comportamentais na hora das refeições, recusa alimentar e preferência por textura ou cheiro específico também foram descritos por Bandini *et al.* (2010), Evans *et al.* (2012), Zimmer *et al.* (2012).

Alguns estudos apontaram que a ingestão total de calorias e proteínas não estão comprometidas no TEA. Porém a ingestão de inúmeras vitaminas e minerais seria insuficiente quando comparada as recomendações de referência e a grupos controle (Herndon *et al.*, 2009; Schmitt *et al.*, 2008).

Há muitas décadas estuda-se a relação entre estado nutricional e a função imunológica. Como exemplo temos a desnutrição proteica que reduz as concentrações da maioria dos aminoácidos no plasma, eles são substratos para a formação das células imunológicas além de regularem a proliferação e ativação de linfócitos T, linfócitos B, células natural killer e macrófagos, estado redox das células, expressão gênica, produção de anticorpos, citocinas e outras substâncias citotóxicas (Wu *et al.*, 2014).

Alterações imunológicas em crianças com TEA são descritas desde meados de 1977 (Stubbs *et al.*, 1977) e recentemente o estudo da disfunção imunológica nestes indivíduos tem se expandido. As alterações no sistema imunológico encontrada em crianças com TEA tem sido relacionado a etiologia, distinção dos subtipos e a severidade dos sintomas (Meltzer and Water, 2017; Hesapcioglu *et al.*, 2017; Enstrom *et al.*, 2010; Kutlu and Cevher Binici, 2018; Nurmalia *et al.*, 2020).

Evidências apontam que a exposição a inflamação no período pré-gestacional correlaciona-se a etiologia do TEA (Meltzer and Water, 2017). A ativação do sistema imunológico materno altera o funcionamento placentário através do aumento do fluxo sanguíneo, transporte de anticorpos e citocinas através da placenta para a circulação fetal com passagem pela barreira hematoencefálica do feto, alterando o seu neurodesenvolvimento em diferentes níveis (Anderson *et al.*, 2007; Depino, 2013).

A disfunção inflamatória observada em indivíduos com TEA também está implicada na etiologia de comorbidades associadas a este distúrbio, a exemplo da epilepsia que é observada em 6-27% dos pacientes com TEA (Bozzi *et al.*, 2018; Jeste & Tuchman, 2015). Foi observado nestes pacientes níveis aumentados de autoanticorpos contra proteínas cerebrais específicas, imunoglobulinas no sangue,

citocinas no cérebro, líquido cefalorraquidiano e sangue (Estes and McAllister., 2015; Frye *et al.*, 2016; Bozzi *et al.*, 2018).

A distinção entre os subtipos de autismo, maior severidade dos sintomas, estereotípias e deficiências cognitivas tem sido relacionada a disfunção inflamatória, devido ao aumento no número de células do sistema imunológico (Hesapcioglu *et al.*,2017), bem como a sua exacerbação na liberação de citocinas inflamatórias (Enstrom *et al.*, 2010; Jyonouchi and Geng, 2020) e de anticorpos (Piras *et al.*, 2014).

Alguns estudos têm investigado o estado imunológico de crianças com TEA através de um exame de baixa complexidade e custo, o hemograma. A contagem de células sanguíneas, que pode fornecer informações da composição celular, como do número de glóbulos vermelhos, leucócitos totais, monócitos, neutrófilos, linfócitos, basófilos e eosinófilos bem como permitem o cálculo das razões celulares (Balta *et al.*, 2015; Hesapcioglu *et al.*,2017; Yonk *et al.*, 1990; Sweeten *et al.*, 2003; Ashwood *et al.*, 2011; Kutlu and Cevher Binici, 2018; Kulaksizoglu and Koparan, 2019).

2.2 Células sanguíneas da série branca

O organismo humano possui um sistema especial de proteção para combater as diferentes infecções e agentes tóxicos. Esse sistema é formado pelos leucócitos (células sanguíneas da série branca) e células teciduais derivadas dos leucócitos. Essas células atuam em conjunto de dois modos para impedir a doença: destruição das bactérias ou dos vírus por fagocitose e pela formação de anticorpos pelos linfócitos sensibilizados capazes de destruir ou inativar o invasor (Hall, 2015).

Os leucócitos, são as unidades móveis do sistema protetor do corpo. Seis tipos desta célula estão presentes no sangue: os neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e ocasionalmente, plasmócitos (Hall, 2015).

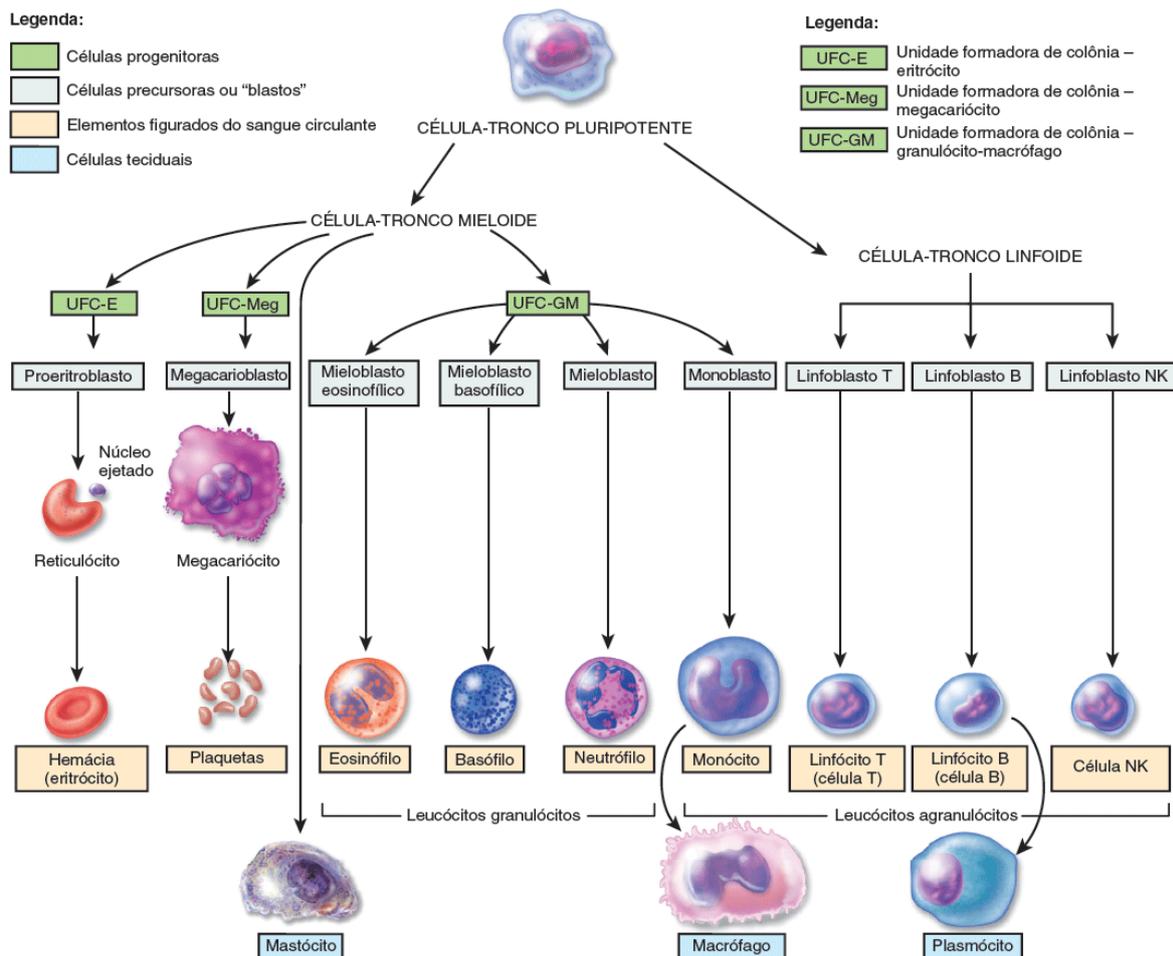


Figura 1. Origem e desenvolvimento das linhagens das células sanguíneas.

Fonte: Tortora e Derrickson, 2016, p. 670.

As células-tronco na medula óssea vermelha se reproduzem, proliferam e diferenciam em células sanguíneas bem como outros tipos de células. A fim de formar as células sanguíneas, as células-tronco pluripotentes na medula óssea produzem mais dois tipos de células-tronco, que possuem a capacidade de se desenvolver em diferentes tipos celulares, dentre elas as chamadas de células mieloide e linfóides (Cruvinel *et al.*, 2010; Tortora e Derrickson, 2016). As células mieloides começam o seu desenvolvimento na medula óssea vermelha e dão origem a hemácias, plaquetas, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos. As células linfóides, que dão origem aos linfócitos, começam o seu desenvolvimento na medula óssea vermelha, porém o completam nos tecidos linfogênicos (linfonodos, baço, timo, tonsilas e nas placas de Peyer, abaixo do epitélio da parede intestinal (Calder, 2006; Cruvinel *et al.*, 2010; Hall, 2015; Tortora e Derrickson, 2016). A Figura 1 apresenta a origem e diferenciação das células sanguíneas, o lado esquerdo mostra a linhagem mieloide e o direito a linhagem linfóide (Tortora e Derrickson, 2016).

Os leucócitos formados na medula óssea ficam armazenados até que sejam necessários no sistema circulatório. Quando surge a necessidade, vários fatores provocam a liberação destas células. Normalmente, o triplo do número de leucócitos circulantes no sangue está armazenado na medula. Os linfócitos são armazenados, em sua maioria, nos diversos tecidos linfoides, um pequeno número está sendo temporariamente transportado pelo sangue (Hall, 2015).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, são células maduras que podem atacar e destruir bactérias, mesmo no sangue circulante através da fagocitose, em geral, consegue fagocitar cerca de 3 a 20 bactérias, antes de ser inativado e sofrer apoptose (Cruvinel *et al.* 2010).

Os monócitos constituem de 3 a 8% dos leucócitos circulantes, e possuem curto tempo de trânsito, de 10 a 20 horas no sangue, antes de atravessar as membranas capilares em direção aos tecidos. Uma vez nos tecidos essas células amadurecem como macrófagos. Os monócitos têm um papel importante em ambos os níveis da imunidade, inata e adaptativa. Suas funções na imunidade inata são fagocitar microrganismos e produzir citocinas que ativam outras células inflamatórias. Na imunidade adaptativa eles têm a função de apresentar de antígenos (Hall, 2015; Abbas *et al.* 2007).

Os macrófagos teciduais começam sua vida como monócitos no sangue. Entretanto, assim que essas células entram nos tecidos, elas começam a aumentar de volume, seus diâmetros podem aumentar até cinco vezes e seu tamanho pode ser visto a olho nu. Essas células são muito eficazes no combate a agentes patológicos intra-teciduais através da fagocitose. Quando ativados pelo sistema imune, eles são fagócitos muito mais potentes que os neutrófilos, capazes de envolver partículas maiores que as bactérias e de fagocitar até 100 bactérias. Os macrófagos teciduais fixos podem atuar em diferentes órgãos como pele e tecidos subcutâneos, linfonodos, fígado, pulmões, baço, medula óssea e podem permanecer por meses a anos, atuando como verdadeiras sentinelas a menos que sejam destruídos durante a execução de suas funções fagocíticas (Cruvinel *et al.*, 2010; Abbas e Lichtman, 2003).

Os eosinófilos normalmente constituem cerca de 2% de todos os leucócitos encontrados no sangue, produzem e armazenam muitos grânulos proteolíticos antes de saírem da medula. Após a sua maturação, circulam pela corrente sanguínea em pequenas quantidades, podendo ser encontrados em maior número nas regiões de

mucosas, como do trato gastrintestinal, respiratório e geniturinário (Abbas e Lichtman, 2003).

Os eosinófilos são fagócitos fracos, mas são importantes no combate a infecções, sendo sua ação antiparasitária (helmintos) uma das mais potentes e eficazes do organismo, também são importantes nas reações alérgicas e asma (Parkin e Cohen, 2001; Cruvinel *et al.*, 2010; Hall, 2015).

Os basófilos são derivados de progenitores da medula óssea, onde amadurecem e constituem menos de 1% dos leucócitos do sangue periférico. Eles se parecem com mastócitos que ficam situados fora de muitos capilares do corpo. Embora não estejam normalmente presentes nos tecidos, podem ser recrutados para sítios inflamatórios, em conjunto com eosinófilos (Parkin e Cohen, 2001; Cruvinel *et al.*, 2010).

Os linfócitos após formados terminam, com o passar do tempo, no tecido linfóide, mas antes disso eles se diferenciam ainda mais ou são “pré-processados”. Os linfócitos entram de forma contínua no sistema circulatório, junto com a drenagem da linfa dos linfonodos e de outros tecidos linfóides. Depois de algumas horas, passam do sangue de volta para os tecidos por diapedese. Então, passado algum tempo, eles retornam da linfa para o sangue várias vezes, desenvolvendo uma circulação contínua de linfócitos por todo o corpo. Eles têm uma sobrevivência que varia de semanas a meses, dependendo da necessidade do organismo (Parkin e Cohen, 2001; Hall, 2015).

Os linfócitos possuem duas principais subdivisões: as células progenitoras linfóides que se destinam a formar linfócitos T ativados migram para o timo, onde são pré-processadas, e ficam conhecidos como linfócitos T, responsáveis pela imunidade mediada por células (Parkin e Cohen, 2001; Hall, 2015).

A outra população de linfócitos, os linfócitos B - destinados a formar anticorpos - são pré-processados no fígado durante a parte média da gestação, e na medula óssea, no final da vida fetal e logo após o nascimento. Esta população de linfócitos é responsável pela imunidade humoral (Parkin e Cohen, 2001; Hall, 2015).

O corpo humano tem a capacidade de resistir contra quase todos os tipos de microrganismos ou toxinas que tendam a lesar os tecidos e órgãos. Essa capacidade é chamada imunidade (Hall, 2015). O sistema imunológico protege o hospedeiro de vários patógenos e se caracteriza por duas formas, o sistema inato (natural, não específico) e adquirido (adaptável, específico). Esses dois sistemas

estão altamente inter-relacionados através de citocinas e moléculas de sinalização (Calder, 2006).

O sistema imunológico inato consiste em barreiras físicas (pele, camada celular endotelial no trato respiratório e gastrointestinal), fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos), células dendríticas, granulócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mastócitos, células natural killer (NK), plaquetas e fatores humorais, incluindo lisozimas, proteínas C-reativas e interferons. Este sistema pode responder rapidamente aos microorganismos invasores, mas suas principais desvantagens incluem a não-especificidade e falta de memória (Buchanan *et al.*, 2006).

Quando a infecção não pode ser totalmente eliminada pela imunidade inata em um curto período, o sistema imunológico adaptativo é ativado para destruir os agentes infecciosos (Li *et al.*, 2007). O sistema imunológico adaptativo (adquirido) é uma imunidade específica que ocorre por meio de anticorpos e/ou linfócitos e fatores humorais, extremamente potente contra agentes invasores individuais como bactérias, vírus, toxinas letais e até mesmo tecidos estranhos de outros animais (Hall, 2015).

Nosso organismo desenvolve dois tipos básicos e aliados de imunidade adquirida. Uma delas, o corpo desenvolve anticorpos circulantes, capazes de atacar o agente invasor, chamado de imunidade humoral ou imunidade das células B (os linfócitos B produzem os anticorpos). O segundo tipo é dependente da formação de grande número de linfócitos T ativados, chamada de imunidade mediada por células ou imunidade das células T (Parkin e Cohen, 2001; Hall, 2015).

A inflamação é uma das causas da desregulação do sistema imunológico e podem desencadear a neuroinflamação que tem sido associada a muitas doenças neurológicas e neuropsiquiátricas. Os mecanismos desta relação permanecem sendo investigados. Até o momento a literatura evidencia que a inflamação através do aumento no número de células do sistema imunológico, liberação de citocinas centrais e periféricas e a expressão celular estão associados ao desenvolvimento do TEA através da neuroinflamação (Enstrom *et al.*, 2010; Depino, 2013; Meltzer e Water, 2017).

O sistema imunológico e a neuroinflamação parecem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento do TEA, assim como a regulação da patogênese e a sua sintomatologia (Bjørklund *et al.*, 2016). Evidências sugerem que a exposição a alterações imunológicas maternas afeta o desenvolvimento neural do bebê ainda

no ambiente intrauterino (Depino, 2013). Essas exposições podem iniciar primeiramente através da alteração do funcionamento da placenta, como modificações no fluxo sanguíneo, nas inclusões trofoblásticas e os anticorpos maternos acessando a circulação fetal (Anderson *et al.*, 2007).

Durante o desenvolvimento do feto as citocinas e quimiocinas estão em baixo nível no seu SNC, desempenhando um papel na diferenciação neuronal, migração de células da glia e na diferenciação e maturação sináptica. O aumento nos níveis de certas citocinas e quimiocinas no sangue materno podem alcançar o cérebro do feto e afetar o desenvolvimento cerebral em diferentes níveis (Depino, 2013).

O desenvolvimento cerebral continua após o nascimento, portanto processos inflamatórios e a ativação imune pós-natal também afetam a maturação neuronal, formação de sinapses e a neuroplasticidade, junto com a remoção de neurônios apoptóticos (Depino, 2013). Inúmeros estudos têm apontado um estado de neuroinflamação em crianças autistas através de respostas imunológicas inatas anormais, com produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e alterada resposta anti-inflamatória (Enstrom *et al.*, 2010; Jyonouchi *et al.*, 2002).

A resposta imunológica se desenvolve com a idade, estudos realizados com uma ampla faixa etária de indivíduos com TEA indicam alterações do sistema imunológico nas diferentes faixas etárias destes indivíduos (Mead e Ashwood, 2015; Lopez-Cacho *et al.* 2016).

Pesquisas tem encontrado correlação significativa entre as alterações na liberação de anticorpos, citocinas e no aumento do número de células sanguíneas do sistema imune com disfunções comportamentais, diminuição da cognição (Piras *et al.*, 2014), funcionamento adaptativo, gravidade (Hesapcioglu *et al.*, 2017; Kutlu e Cevher Binici, 2018) e estereotipias em crianças com TEA (Mostafa e AlAyadhi, 2012).

Estudos recentes relataram que crianças com TEA podem ter diferentes fenótipos e subfenótipos de células imunes. A relação entre o TEA e o comprometimento da função imunológica necessita de estudos para sua compreensão. As células linfócitos T e seus subtipos, que desempenham um papel determinante na imunidade adaptativa, apresentam-se em menor número e porcentagem nestes indivíduos (Yonk *et al.*, 1990; Mead e Ashwood, 2015; Lopez-Cacho *et al.*, 2016; Sweeten *et al.*, 2003, Ashwood *et al.*, 2011).

O cálculo das proporções celulares, como a razão neutrófilo linfócito (RNL), razão monócitos linfócitos (RML) e linfocitometria podem ser usados como marcadores de respostas inflamatórias (Hesapcioglu *et al.*, 2017).

A razão neutrófilos linfócitos (RNL), é calculada através da porcentagem dos neutrófilos pela porcentagem de linfócitos, valores encontrados no hemograma (Nurmalia, *et al.*, 2020). A RNL é um marcador simples e indica uma inflamação sistêmica (Kulaksizoglu e Koparan, 2019). Ela tem sido investigada em uma variedade de doenças, incluindo condições inflamatórias cardiovasculares, neoplásicas e distúrbios neuropsiquiátricos (Beliaev *et al.*, 2016; Turri-Zanoni *et al.*, 2017; Semiz *et al.*, 2014).

A razão monócito linfócito (RML) é calculada através do valor da contagem total de monócitos e linfócitos, obtidos no hemograma. Esta razão tem sido indicada como biomarcador de inflamação crônica e como prognóstico em inúmeras doenças, sua diminuição representa um processo inflamatório crônico e indica redução de sobrevida (Hutterer *et al.*, 2015; Hesapcioglu *et al.*, 2017).

Os linfócitos e leucócitos periféricos, usados para calcular a linfocitometria, medem as reservas imunológicas momentâneas, indicando as condições de defesa celular do organismo, que sofre interferência direta do estado nutricional, ou seja, quanto menor os valores encontrados na linfocitometria pior é o estado nutricional do paciente. Portanto, além de medir a competência imunológica, a linfocitometria também serve como parâmetro indicador do estado nutricional (Rocha e Fortes, 2013). No entanto, a CTL como indicador nutricional é limitada em casos de infecções, cirrose hepática, queimaduras e uso de alguns medicamentos, presença de infecção, síndrome da imunodeficiência adquirida, câncer terminal, doenças agudas e lúpus (Oliveira *et al.*, 2008).

A razão entre células sanguíneas da série branca também tem sido utilizada em estudos recentes para análise do estado inflamatório dos indivíduos com TEA e sua relação com a etiologia, gravidade e sintomas do transtorno. A razão monócito/linfócito foi estudada por Hesapcioglu *et al.* (2017) que encontrou uma correlação negativa com a gravidade dos sintomas, quanto menor o valor de RML maior a gravidade do autismo. A razão neutrófilo/linfócito foi avaliada em alguns estudos que encontraram em crianças com TEA valores maiores de RNL, este aumento esteve associado a maior a gravidade do TEA (Kutlu e Cevher Binici, 2018; Kulaksizoglu e Koparan, 2019). As alterações nessas proporções indicam disfunção imunológica nestes indivíduos e a sua relação com a fisiopatologia, gravidade e

sintomas do TEA, mas devem ser usados associado a outros biomarcadores (Hesapcioglu *et al.*, 2017; Kutlu e Cevher Binici, 2018; Kulaksizoglu e Koparan, 2019, Nurmalia *et al.*, 2020).

As alterações na imunidade também são estudadas através de outros biomarcadores como anticorpos, nível de expressão celular, imunoglobulinas e citocinas liberadas pelas células sanguíneas da série branca. O uso destes biomarcadores possibilita a identificação das disfunções imunológicas nos indivíduos com TEA e a sua relação com a neuroinflamação, contudo também necessitam de mais pesquisas para explicar os mecanismos dessa relação com as mudanças neurológicas e comportamentais no TEA (Sweeten *et al.* 2003; Zerbo *et al.* 2014; López-Cacho *et al.* 2016; Pecorelli *et al.* 2016; Bjørklund *et al.*,2016)

3. Revisão da literatura

A revisão da literatura identificou artigos que investigassem a contagem de células sanguíneas da série branca e as suas proporções em crianças com TEA. Buscou-se referências na plataforma de dados PubMed e também no Google Acadêmico. Na plataforma PubMed foram usados os descritores de acordo com os termos de Medical Subject Headings (MeSH): *leukocytes count AND autism spectrum disorder e monocytes AND autism spectrum disorder*. No Google Acadêmico foi utilizada a chave de busca “*autism spectrum disorder*” AND *monocytes lymphocytes*.

Os limites estabelecidos para a busca foram estudos realizados com humanos, sem restrição de anos. Os termos utilizados para as pesquisas, suas combinações e o número de artigos localizados estão apresentados no Quadro 1.

O processo de seleção dos artigos para integrarem este projeto de pesquisa seguiu os seguintes passos:

- 1) Leitura dos títulos dos artigos científicos com os descritores (Quadro 1) identificados nas bases de dados;
- 2) Seleção de títulos relevantes;
- 3) Leitura dos resumos dos artigos científicos cujos títulos foram identificados como relevantes;
- 4) Seleção dos resumos relevantes para leitura do documento na íntegra;
- 5) Leitura na íntegra dos artigos selecionados como relevantes;

6) Seleção dos estudos considerados importantes para o estudo.

Embora tenha sido estabelecido limites na busca dos estudos, ainda foi necessário aplicar alguns critérios de exclusão após a leitura dos resumos. Os critérios de exclusão foram estudos de revisão sistemática, estudos experimentais realizados com animais e testes in vitro.

Foram encontrados, ao total, 2.197 artigos, exportados para o programa Zotero. Após exclusão de 12 duplicatas, restaram 2185 artigos para análise. Posteriormente a leitura dos títulos, 56 tiveram seus resumos lidos e 24 foram selecionados para leitura final. Após leitura, na íntegra, 16 artigos foram excluídos, por não corresponderem aos critérios de inclusão.

Dessa forma, foram selecionados 8 artigos científicos para comporem o presente projeto de pesquisa, os quais se encontram resumidos no Quadro 2.

Base de dados	Descritores	Artigos encontrados	Duplicatas	Leitura de resumo	Leitura na íntegra	Artigos relevantes
Pubmed	“leukocytes count” AND “autism spectrum disorder”	19	12	11	5	2
	“monocytes” AND “autism spectrum disorder”	48		13	7	2
Google Acadêmico	“autism spectrum disorder” AND “monocytes lymphocytes”	2.130		32	12	4
Total						8

Figura 2. Quadro da descrição das buscas pelos artigos nas bases de dados para o quadro de revisão.

Autor e ano	Tipo de estudo	Amostra	Objetivo	Metodologia	Principais resultados	Conclusão
Yonk <i>et al.</i> , 1990.	Estudo transversal	<p>-N=25 indivíduos com autismo, 25 irmãos dos indivíduos com autismo e 20 indivíduos saudáveis.</p> <p>-Idade: 2 a 31 anos.</p>	<p>Investigar a possibilidade de anormalidades imunológicas no autismo, através da exploração do número de linfócitos T e B usando análise de citometria de fluxo.</p>	<p><u>Recrutamento:</u></p> <p>-Crianças com autismo e seus irmãos;</p> <p>-Crianças com desenvolvimento típico, escolhidos aleatoriamente na mesma área geográfica das crianças com autismo.</p> <p><u>Dados coletados:</u></p> <p>- Diagnóstico autismo através critérios DSM III;</p> <p>-Indivíduos saudáveis recrutados na mesma área geográfica dos autistas e seus irmãos;</p> <p>-Ausência de infecções e febre;</p> <p>-Coleta de sangue: contagem total das células sanguíneas brancas, linfócitos e suas subpopulações.</p>	<p>Os indivíduos autistas apresentaram valores significativamente mais baixos na porcentagem total de linfócitos (44%), e no número das subpopulações CD2 (2006 mm³), CD20 (418 mm³) e CD4 (1025 mm³) e porcentagem CD4 (39%), enquanto nos seus irmãos os valores encontrados foram a porcentagem total de linfócitos 53%, número das subpopulações CD2 (2690 mm³), CD20 (506 mm³), CD4 (1427 mm³) e porcentagem CD4 42%, já no grupo com desenvolvimento típico porcentagem total de linfócitos foi de 55%, e o número das subpopulações CD2 (2522 mm³), CD20 512 mm³, CD4 (1493 mm³) e a porcentagem de CD4 foi de 47%.</p> <p>Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os irmãos de indivíduos com autismo e os indivíduos saudáveis no número e porcentagem das células.</p> <p>Irmãos do sexo masculino apresentaram valor significativamente menor na porcentagem das células CD4 (40%) e aumento da porcentagem CD8 (24%) em comparação a indivíduos com desenvolvimento típico que</p>	<p>Estudos adicionais devem ser realizados para investigar as deficiências nas subpopulações dos linfócitos, principalmente nas células T CD4.</p> <p>Estas descobertas apontam que as alterações imunológicas podem causar esta desordem do desenvolvimento, também sugerem uma relação entre a transmissão genética da deficiência das células T CD4.</p>

					apresentaram como valor de porcentagem das células CD4 (46%) e CD8 (20%).	
Sweeten <i>et al.</i> , 2003.	Estudo transversal	<p>- N= 31 crianças com TEA e 28 crianças com desenvolvimento típico</p> <p>-Idade: 2 a 12 anos.</p>	Comparar a contagem de leucócitos e os níveis plasmáticos de neopterin em crianças autistas com crianças saudáveis.	<p><u>Recrutamento:</u></p> <p>- Crianças autistas: Centro de tratamento do autismo do Hospital James Whitcomb Riley</p> <p>- Grupo controle: Através de folhetos e informativos da comunidade próximo ao hospital.</p> <p><u>Dados coletados:</u></p> <p>-Exame físico: rastreamento patologias e febre.</p> <p>-Coleta de sangue: Realizada em jejum para determinação dos números de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos e leucócitos totais e nível de neopterin plasmática,</p>	<p>A contagem de monócitos absolutos foi significativamente maior em crianças autistas ($0.588 \times 10^3/\text{mm}^3$) do que nas crianças com desenvolvimento típico ($0.491 \times 10^3/\text{mm}^3$)</p> <p>Não foram encontradas diferenças entre os grupos na contagem absoluta total de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, contagem e porcentagem de linfócitos, e porcentagem de monócitos.</p> <p>Os níveis de neopterin plasmática também foram significativamente maiores no grupo autista (7.94 nmol/l) do que no grupo de crianças com desenvolvimento típico (7.94 nmol/l).</p> <p>Não houve correlação dos valores de neopterin e monócitos com a idade e QI em ambos os grupos estudados.</p>	<p>Embora não tenha sido encontrada correlação entre contagem de monócitos e nível de neopterin, sua elevação simultânea indica ativação de monócitos/macrófagos, com aumento da imunidade mediada por células em indivíduos autistas.</p>
	Estudo transversal	-N= 17 crianças com TEA e 16 crianças com	Examinar a resposta de culturas de monócitos para patógenos ambientais para	<p><u>Recrutamento:</u></p> <p>Todas as crianças participavam do estudo Riscos</p>	Não houve diferenças significativas no número de monócitos isolados das crianças	O aumento de citocinas liberadas pelos ligantes TLR 2 e 4 refletem

Enstrom <i>et al.</i> , 2010		desenvolvimento típico (DT)	determinar se há diferença na resposta destas células de crianças com TEA e com desenvolvimento típico.	de autismo infantil de Genética e Meio Ambiente do Instituto Médico de Investigação de Distúrbios do Neurodesenvolvimento. <u>-Dados coletados:</u> - Crianças com TEA: Manual Estatístico de Diagnóstico (DSM -IV); Cronograma de observação Diagnóstico de Autismo (ADOS) Entrevista diagnóstica de autismo (ADI-R). -Crianças com desenvolvimento típico: Questionário de Comunicação Social (QCS); Escala Mullen de Aprendizado Precoce (MSEL) e Escalas de Avaliações cognitivas de Comportamento Adaptativo Vineland (VABS). - Ausência de febre e de uso de medicamentos antipsicóticos e imunomoduladores. - Isolamento dos monócitos, estimulação e quantificação da secreção de citocinas pelos monócitos.	com TEA em comparação com controles DT. Houve aumento estatisticamente significativo na liberação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α quando estimulado ligantes TLR 2 e aumento IL-1 β no ligante TLR 4 pelos monócitos de crianças com TEA. Houve associação entre o aumento de citocina IL-1 β com a deficiência na interação social, comunicação não verbal medidas pela ADI-R. A liberação IL-6 teve associação com a interação social medido pela ADOS.	uma resposta imune inata alterada em crianças com TEA. A alteração na resposta imune pode causar efeitos generalizados no sistema imunológico afetando também a atividade neuronal, causando alterações no neurodesenvolvimento e potencializando as características do TEA.
	Estudo transversal	-N= 70 crianças com TEA e 35 crianças	Avaliar as mudanças na frequência e diferenças imuno específicas de fenótipos	<u>Recrutamento:</u>	A maioria das diferenças encontradas foram entre o grupo de crianças com TEA e grupo controle, não foram	Os resultados demonstram que há uma disfunção imunológica em algumas crianças com autismo. É necessária uma avaliação mais

<p>Ashwood <i>et al.</i>, 2011</p>		<p>desenvolvimento típico.</p> <p>-Idade: 4 a 6 anos.</p>	<p>celulares em crianças com autismo, para torna-los possíveis biomarcadores do TEA.</p>	<p>-Crianças com TEA: Clínicas e centros de atendimento ao autistas.</p> <p>-Grupo controle: Escolas e centros comunitários da mesma área do grupo com TEA.</p> <p><u>Dados coletados:</u></p> <p>-Diagnóstico do Autismo: Cronograma de Observação Diagnóstica do Autismo (CODA) e Pesquisa em Diagnóstico do Autismo (PDA)</p> <p>-Escala de Inteligência Stanford-Binet (SB): Crianças de ambos os grupos</p> <p>-Escala de Comportamento Adaptativo Vineland (ECAV): Crianças de ambos os grupos</p> <p>-Subdivisão grupo com TEA: Alto funcionamento (AF) e baixo funcionamento (BF).</p> <p>-Formulário de histórico médico.</p> <p>-Coleta de sangue: Em jejum para contagem das células granulócitos, eosinófilos, monócitos, células T CD4 e CD8, células B e células NK, fenotipagem de subtipos celulares e expressão da superfície celular.</p>	<p>encontradas diferenças significativas entre os subgrupos de TEA.</p> <p>As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram o aumento de números absolutos de células B (20% maior) e NK (40% maior) em crianças com TEA comparado as crianças com desenvolvimento típico.</p> <p>O número absoluto total de glóbulos brancos, neutrófilos, células T, subpopulações de células T CD4 e CD8, monócitos, eosinófilos e plaquetas em crianças com autismo foram maiores, mas essas diferenças não atingiram significância estatística.</p> <p>Houve muitas diferenças significativas na intensidade dos marcadores da superfície celular expressos nas células imunes, das 108 intensidades analisadas, 20 apresentaram valores 15% maior no grupo com TEA comparada ao grupo controle.</p>	<p>aprofundada da natureza desta disfunção e seu papel na etiologia e comportamento do autismo.</p> <p>Mais estudos para avaliar o poder clínico e a utilidade de biomarcadores para o autismo, incluindo aqueles relacionados à resposta imune, são necessários para auxiliar na sua determinação e utilidade na assistência ao diagnóstico precoce de autismo.</p>
------------------------------------	--	---	--	---	--	--

Hesapcioglu <i>et al.</i> , 2017	Estudo transversal	-N= 45 crianças com TEA e 43 crianças com desenvolvimento típico.	Investigar o nível de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e suas razões que podem apontar os mecanismos imunológicos envolvidos na etiopatogenia da TEA.	<u>Recrutamento:</u> Pacientes internados no Hospital de Pesquisa e Educação da Universidade Yenimahalle, entre 2012 a 2016. <u>Dados coletados:</u> -Prontuário médico dos pacientes: -Escala de Avaliação do Autismo na Infância (CARS); -Exames de sangue: hemograma, razão neutrófilo/linfócito (RNL), razão linfócito/monócito (RLM). -Subdivisão do grupo com TEA: autismo e autismo atípico.	A contagem de monócitos ($0,46 \times 10^3/\text{mm}^3$) e o RDW (13,96%) no grupo TEA foram significativamente maiores e o RLM (6,35) foi menor do que os do grupo controle onde os valores encontrados foram monócitos ($0,35 \times 10^3/\text{mm}^3$), RDW (13,08%) e RLM (8,18). Houve relação negativa do RLM e total de linfócitos e gravidade do autismo, quanto menor estes valores maior a gravidade do autismo. Correlação positiva entre RNL e gravidade do TEA, reforçando que a diminuição nos linfócitos aumenta gravidade da doença.	O alto nível de monócitos, que é um indicador de inflamação crônica e RLM, que é associados à gravidade do TEA, podem desempenhar um papel no diagnóstico de autismo. Mais estudos são necessários para entender o papel desses parâmetros em mostrar a resposta ao tratamento e redução da gravidade do TEA
Kutlu e Cevher Binici, 2018.	Estudo transversal	-N=64 Crianças com TEA e 64 crianças com desenvolvimento típico. - Idade: 2 a 5 anos.	Investigar a desregulação imune na etiologia do TEA, avaliando a RNL e a RPL em crianças com TEA em comparação com controles saudáveis.	<u>Recrutamento:</u> -Crianças autistas: Departamento de Psiquiatria da Criança e do Adolescente do Hospital de Treinamento e Pesquisa em Cirurgia Pediátrica e Doenças da Criança. -Grupo controle: Clínica Infantil do mesmo hospital. <u>Dados coletados:</u>	O grupo com TEA foi subdivido em autismo 17% e autismo atípico 83%. Não houve diferenças significativas de idade entre os grupos, e a razão meninos/meninas foi de 4,3:1. Os valores de RNL foram significativamente maiores no grupo com TEA (1,03) do que no grupo controle (0,73), mas não foram encontradas diferenças	Os valores de RNL aumentados apoiam a hipótese do envolvimento da neuroinflamação na fisiopatologia do TEA. Embora as evidências recentes não sejam suficientes para sugerir que os níveis aumentados de RNL em crianças podem ser usados como triagem e preditor de intervenção precoce, deve-se considerar a sua relevância e inspirar novos estudos.

				<p>-Inventário de Triagem de Desenvolvimento de Ancara – (ITDA) ou Teste de Triagem de Desenvolvimento de Denver II – (TTDD).</p> <p>-Coleta de sangue: para cálculo razão neutrófilos/linfócitos (RNL) e razão plaquetas/linfócitos (RPL).</p> <p>-Subdivisão grupo com TEA: autismo e autismo atípico.</p>	<p>significativas nos valores de RPL.</p> <p>As crianças com TEA apresentaram contagem de neutrófilos ($3,45 \times 10^3/\text{mm}^3$) significativamente maior, mas linfócitos ($3,64 \times 10^3/\text{mm}^3$) e plaquetas ($318,11 \times 10^3/\text{mm}^3$) significativamente menores em comparação ao grupo saudável: neutrófilos ($3,00 \times 10^3/\text{mm}^3$), linfócitos ($4,11 \times 10^3/\text{mm}^3$) e plaquetas ($349,52 \times 10^3/\text{mm}^3$).</p> <p>Não foram encontradas diferenças significativas nos valores de RNL, RPL e outros parâmetros sanguíneos nos subgrupos de TEA.</p> <p>Indivíduos com autismo atípico apresentaram contagem de neutrófilos significativamente maior ($3,68 \times 10^3/\text{mm}^3$) e menor número de linfócitos ($3,57 \times 10^3/\text{mm}^3$) do que o grupo controle.</p>	
Kulaksizoglu e Koparan, 2019.	Estudo transversal	<p>-N= 67 crianças com TEA e 67 crianças com desenvolvimento típico.</p> <p>- Idade: 5 a 11 anos</p>	<p>Determinar se a contagem total de células sanguíneas pode ser utilizada como indicador da etiopatogenia do TEA, bem como uma</p>	<p><u>Recrutamento:</u></p> <p>-Pacientes do Hospital de Pesquisa e Treinamento da Universidade de Ciências da Saúde na Antália, Turquia.</p> <p><u>Dados coletados:</u></p>	<p>Os valores totais de neutrófilos foi estatisticamente maior ($4,95 \times 10^3/\text{mm}^3$) no grupo com TEA do que no grupo controle ($3,86 \times 10^3/\text{mm}^3$).</p> <p>Os valores de RNL foram significativamente mais altos (1,69) e os de VPM foram</p>	<p>Os valores de RNL aumentado e níveis mais baixos de VPM, que podem ser medidos por testes laboratoriais simples, podem ser usados como ferramentas de triagem e intervenção precoce no TEA.</p>

			ferramenta de para o seu diagnóstico.	-Coleta de sangue: Contagem total de células sanguíneas e cálculo da razão neutrófilos/linfócitos (RNL), razão plaquetas/linfócitos (RPL) e volume plaquetário médio (VPM).	significativamente menores (8,13) nas crianças com TEA do que nas crianças do grupo controle: RNL (1,13) e VPM (8,13). Não houve diferença estatisticament e significativa entre os dois grupos nos valores de RPL, número monócitos e contagem de plaquetas.	Os valores de RNL e VPM podem revelar-se importantes biomarcadores para TEA, além de apoiar a presença de neuroinflamação na etiopatogenia do TEA.
Nurmalia et al, 2020	Estudo transversal	-N= 26 crianças com TEA e 43 crianças com desenvolvimento típico.	Determinar a precisão da razão neutrófilo linfócito (RNL) na inflamação do TEA através de teste de laboratório barato, simples e prático.	<u>Recrutamento:</u> -Clínica Pediátrica de Desenvolvimento Social do Hospital Dr. Mohammad Hoesin, <u>Dados coletados:</u> -Dados dos prontuários médicos; -Diagnóstico TEA: DMS-V ou CID 10 -Teste hematológico: contagem absoluta neutrófilos, linfócitos e cálculo proporção neutrófilos/linfócitos. -Exclusão do estudo com crianças infecções, alergias e doenças malignas.	O valor da contagem absoluta de neutrófilos foi de $3,88 \pm 0,24 \times 10^6 /\mu\text{L}$, linfócitos $4,15 \pm 0,3 \times 10^6 /\mu\text{L}$ e o valor médio de RNL foi $1,01 \pm 0,07$, no grupo de crianças com TEA, semelhante ao encontrado em outros estudos. Os testes de diagnóstico foram realizados para determinar a precisão do RNL para diagnosticar TEA com um padrão ouro (diagnóstico foi feito por pediatras usando critérios DSM-V). Foi determinado um ponto de corte do RNL, valor de 0,68 para determinar como positivo ou negativo precisão do exame no diagnóstico do TEA.	Os valores da razão neutrófilos para linfócitos são sensíveis para o diagnóstico do TEA, mas sua precisão é baixa. Outros marcadores inflamatórios são necessários para melhorar a precisão dos testes de laboratório no diagnóstico do TEA.

					<p>A RNL teve sensibilidade de 84,6% no diagnóstico de TEA, a especificidade foi de 27,9%.</p> <p>O valor preditivo positivo para o diagnóstico do TEA foi de 41,5% e o negativo 25%.</p> <p>O $NLR \geq 0,68$ mostrou probabilidade positiva de 1,17 e uma razão de verossimilhança negativa de 0,55.</p> <p>A acurácia do RNL no diagnóstico do TEA foi de 50,2%, interpretado como muito fraco.</p>	
<p>Abreviações: DSM – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; NK- natural Killer; RNL- razão neutrófilo linfócito; RML- razão monócito linfócito; RDW- Red Cell Distribution Width; RPL- razão plaquetas linfócitos; CID- Classificação Internacional de Doenças e Problemas relacionados à Saúde.</p>						

Figura 3. Quadro com o resumo dos principais trabalhos encontrados sobre Transtorno Espectro Autista e contagem de células sanguíneas.

3.1 Descrição da revisão da literatura

Todos os artigos inseridos nesta revisão, que estudam as células sanguíneas da série branca em crianças com TEA são do tipo transversal. A totalidade dos trabalhos fazem a comparação da contagem das células sanguíneas das crianças com TEA com a de crianças com desenvolvimento típico (DT).

O tamanho amostral destes estudos variou de 17 a 70 crianças com TEA, e nos grupos controle, 16 a 67 crianças com desenvolvimento típico. Os participantes do grupo controle destes estudos foram recrutados em áreas próximas as crianças do transtorno, idade e nível socioeconômico de ambos os grupos foram semelhantes.

A maioria dos estudos teve como objetivo principal a contagem absoluta das células sanguíneas em crianças com TEA. Yonk *et al.* (1990) investigou as disfunções imunológicas de autistas através da contagem dos linfócitos, em especial a subpopulação linfócitos T, encontraram valores significativamente mais baixo destas células em indivíduos com TEA em comparação a seus irmãos e indivíduos saudáveis, confirmando a presença de alterações imunológicas em indivíduos com TEA.

Sweeten *et al.* (2013) encontraram valores significativamente maiores de leucócitos em crianças com o transtorno, semelhante ao encontrado por Hesapcioglu e seus colaboradores (2017) que encontraram ainda, valores maiores de monócitos e RDW nestas crianças. No estudo de Ashwood *et al.* (2011) foram estatisticamente maiores a contagem das células B e *natural killer* (NK) no grupo com TEA as demais células avaliadas apresentaram valores maiores, mas sem diferenças estatisticamente significativas. Kutlu e Cevher Binici (2018) encontraram como diferenças estatisticamente significativas os elevados valores de neutrófilos e baixo número de plaquetas em crianças com TEA.

Dentre os estudos selecionados, 4 também analisaram o cálculo da razão de algumas células sanguíneas como indicadores do estado imunológico, são elas: razão neutrófilo/linfócito (RNL), razão monócito/linfócito (RML), razão plaquetas/linfócitos (RPL). Ambos os trabalhos encontraram os valores de RNL maiores em crianças com TEA que no grupo de crianças com desenvolvimento

típico (Kutlu e Cevher Binici, 2018; Kulaksizoglu e Koparan, 2019; Hesapcioglu *et al.*, 2017; Nurmalia *et al.*, 2020). Foi analisada a precisão da RNL no diagnóstico do TEA, este marcador se mostrou sensível, mas com baixa precisão para esta finalidade, sugerindo seu uso junto a outros indicadores de inflamação (Nurmalia *et al.*, 2020).

A razão RLM foi menor nas crianças com TEA (Hesapcioglu *et al.*, 2017), enquanto na análise dos valores de RPL não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Kutlu e Cevher Binici, 2018; Kulaksizoglu e Koparan, 2019).

A comparação entre subtipos de TEA e a contagem de células sanguíneas e suas razões foi realizada por 3 estudos. As subdivisões realizadas foram alto e baixo funcionamento (Ashwood *et al.*, 2011) e autismo típico e atípico (Hesapcioglu *et al.*, 2017; Kutlu e Cevher Binici, 2018). Ashwood *et al.*, (2011) e Kutlu e Cevher Binici. (2018) não encontraram diferenças significativas entre os dois grupos. Hesapcioglu *et al.* (2017) encontraram uma relação estatisticamente significativa entre os valores menores de RML e maiores de RNL no grupo de crianças com autismo típico, relacionando estes indicadores com o aumento da gravidade dos sintomas.

Três estudos realizaram análises secundárias a contagem de células sanguíneas. Sweeten *et al.* (2013) analisou a relação dos níveis plasmáticos de neopterin em crianças autistas e com desenvolvimento típico, encontrou valores significativamente maiores em crianças com TEA. Ashwood *et al.* (2011) verificou a fenotipagem de subtipos celulares e a expressão da superfície celular, encontrando valores maiores nas subpopulações de células T CD4 e T CD8, mas sem alcançar significância estatística. Já os valores da expressão da superfície celular foram aproximadamente 15% maiores em crianças autistas do que no grupo controle. Enstrom *et al.* (2010) comparou a resposta de uma cultura de monócitos a patógenos ambientais entre crianças com TEA e desenvolvimento típico. O número absoluto dos monócitos não alcançou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mas nas crianças com TEA a resposta destas células foi exacerbada, e esteve relacionada a deficiência na interação social e comunicação não verbal.

Os trabalhos possuem como ponto fraco o pequeno tamanho amostral e características retrospectivas, que podem fragilizar as afirmações sobre as

disfunções da imunidade, sua relação com a etiopatogenia e gravidade do TEA assim como na utilização destes biomarcadores no diagnóstico de autismo.

4. Justificativa

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento infantil caracterizado por desvios na comunicação social e pela presença de padrões restritos e repetitivos de comportamento e interesses, anormalidades sensoriais e níveis variados de deficiência intelectual (DSM-5).

As alterações imunológicas em crianças com TEA são relatados desde meados de 1977 por Stubbs *et al.*, desde então o estudo da disfunção imunológica nestes indivíduos tem se expandido na literatura. Pesquisas tem encontrado alterações no sistema imunológico dos indivíduos com TEA, indicando estado inflamatório exacerbado (Meltzer e Water, 2015; Careaga *et al.*, 2017). Alguns estudos têm investigado e atribuído as alterações imunológicas, medidas através da contagem de células sanguíneas e suas proporções, na etiologia, gravidade, sintomas e comportamento do TEA (Kutlu e Cevher Binici, 2018; Kulaksizoglu e Koparan, 2019; Hesapcioglu *et al.*, 2017).

A contagem das células sanguíneas e suas subpopulações (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos), medidos através de um exame de sangue rotineiramente utilizado, podem ser empregados como um dos marcadores do sistema imunológico (Failace, 2015; Hesapcioglu *et al.*, 2017). As razões obtidas através das proporções das células monócitos linfócitos e neutrófilos linfócitos podem indicar o estado inflamatório de indivíduos com TEA, possibilitando investigar a relação entre a inflamação com o comportamento alimentar dentre outras associações.

Deste modo, o estudo justifica-se pela necessidade de agregar-se conhecimento sobre a condição do sistema imunológico, avaliado por meio da contagem do número e das proporções das células sanguíneas da série branca, bem como das razões RML e RNL em crianças e adolescentes com TEA. Além disso, o conhecimento gerado permitirá estratégias de tratamento, especialmente em âmbito nutricional, que propiciem a redução de agravos conforme o perfil de células identificado.

5. Objetivos

5.1 Objetivo Geral

Investigar o número e a proporção de células sanguíneas da série branca e a razão monócito linfócito e neutrófilo linfócito, segundo características sociodemográficas, clínicas e comportamentais de crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro do Autismo.

5.2 Objetivos específicos

i Caracterizar a amostra quanto ao:

- a) perfil sócio demográfico;
- b) comportamento alimentar;
- c) aspectos clínicos;
- d) estado nutricional;

ii Descrever a contagem total das células sanguíneas da série branca e as razões monócito/linfócito e neutrófilo/linfócito, segundo características sociodemográficas, clínicas e comportamentais;

iii Investigar a associação entre o número de células sanguíneas estratificado e as características sociodemográficas, clínicas e comportamentais.

iv. Investigar a associação entre a RML e RNL e as características sociodemográficas, clínicas e comportamentais.

5.3 Hipóteses

- O número das células sanguíneas da série branca estará acima dos limites de referência, segundo a faixa etária.
- Uma maior RML será associada a obesidade, ao uso de fármacos psicoativos, a um comportamento mais irritado e a um menor nível de escolaridade materna.
- Uma maior RNL será associada a um comportamento mais irritado e a um menor nível de escolaridade materna.
- A maior parte da amostra será caracterizada por:

i Ser do sexo masculino, da cor da pele branca com excesso de peso, em uso de fármacos psicoativos e ter mães com escolaridade menor de nove anos de estudo;

6. Metodologia

6.1 Delineamento

O presente estudo terá um delineamento transversal e será realizado com dados do estudo de intervenção intitulado: PANA “**Protocolo de Atendimento Nutricional a indivíduos com transtorno do espectro Autista**”.

6.2 Características do estudo PANA, local e período de rastreamento

O estudo PANA tem por objetivo realizar uma intervenção nutricional personalizada para crianças e adolescentes com TEA, do Ambulatório de Neurodesenvolvimento, vinculado a Faculdade de Medicina (FAMED)/UFPEL, localizado no bairro Fragata, na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Neste local, de segunda a sexta-feira é realizado o atendimento de crianças e adolescentes com desordens neurocomportamentais, incluindo o TEA. O protocolo iniciou em outubro de 2018, em março de 2020 as atividades presenciais e coleta de dados foram interrompidas devido a pandemia pelo SARS-CoV-2, mantendo assistência on-line aos pacientes. Foram convidados a participar do estudo pacientes com idade entre 3 a 18 anos, e com ausência de neuropatias e cardiopatia congênita. Para o presente estudo serão utilizados dados de pacientes rastreados e incluídos no PANA no período entre outubro de 2018 a março de 2020.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, sob protocolo nº 2.835.793. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido em duas vias, assinado pelos responsáveis das crianças e adolescentes.

O estudo PANA contempla 5 entrevistas: A **entrevista 1**, após os responsáveis assinarem do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) é aplicado um questionário geral (Apêndice B) sobre variáveis sociodemográficas e de saúde, na aplicação de um recordatório alimentar de 24 horas (R24h) para a criança e cuidador principal e aferição das medidas

antropométricas. A **entrevista 2**, realizada por telefone, consiste na aplicação do segundo R24h (criança/adolescente e cuidador) e agendada a terceira entrevista. Na **entrevista 3** é realizado o terceiro R24h, o questionário do comportamento alimentar da criança (CEBQ) e entregue um voucher para a coleta de sangue, realizada em um laboratório da cidade de Pelotas, com jejum prévio de 8 horas. Na **entrevista 4** é entregue o resultado dos exames bioquímicos e as orientações nutricionais baseadas nos problemas alimentares identificados anteriormente. Na **entrevista 5**, é aplicado um *checklist* para avaliar o alcance das orientações estabelecidas previamente.

A aplicação de questionários, escalas e antropometria é conduzida por alunos de pós-graduação previamente treinados para o estudo. As entrevistas foram conduzidas com a presença do principal responsável pelos cuidados do paciente, identificado segundo seu tempo destinado a permanecer com a criança ou adolescente. Na maioria dos casos, o responsável principal foi a mãe.



Abreviaturas: TCL: Termo de consentimento livre e esclarecido; Quest.: Questionário; R24h: recordatório alimentar de 24 horas; CEBQ: questionário do comportamento alimentar da criança.

Figura 4. Fluxograma do estudo PANA.

6.3 População e Amostra

A população caracteriza-se por crianças e adolescentes, com idade entre 3 e 18 anos com diagnóstico de TEA atendidos no Ambulatório de Neurodesenvolvimento, FAMED/UFPEL, Pelotas-RS.

A amostra será constituída por todas as crianças e adolescentes recrutadas no período do estudo que atenderem aos critérios de inclusão e exclusão para a presente pesquisa.

6.4 Critérios de inclusão e exclusão

Serão inclusos crianças e adolescentes, com idade entre 3 e 18 anos, que após avaliação de neuropediatra atenderem a diagnóstico de TEA.

Serão excluídos aqueles que não completaram a etapa de coleta de sangue e que apresentarem diagnóstico médico de neuropatias, cardiopatia congênita e/ou outras condições que não forem compatíveis com a coleta de amostra de sangue.

6.5 Variáveis

6.5.1 Variáveis dependentes

6.5.1.1 Contagem células sanguíneas da série branca

Uma amostra de 5 mL de sangue será coletada em laboratório de análises clínicas, por meio de punção venosa, com jejum prévio de 8 horas para realização do leucograma. Este procedimento foi realizado por profissionais técnicos experientes para esse procedimento, obedecendo as técnicas vigentes estabelecidas. As amostras de sangue serão analisadas por impedância elétrica, em equipamento automático para determinação da contagem total do número de leucócitos e suas subpopulações seguindo as instruções do fabricante (Mindray®, China). O resultado do exame será expresso em valor absoluto de células por milímetro cúbico (mm^3) de sangue e valor relativo considerando o total de leucócitos como referência (100%).

Os valores de referência para os leucócitos totais, neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos utilizados serão os sugeridos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de referência absoluto (mm^3) das células sanguíneas da série branca para crianças a partir de 2 anos de idade.

Idade	Valores de referência (mínimo e máximo)				
	Leucócitos	Neutrófilos	Monócitos	Linfócitos	Eosinófilos
2 a 6 anos	5.000-15.000	1.500-8.000	200– 1.000	6.000-9.000	100-1.000
6 a 12 anos	5.000-13.000	2.000-8.000	200– 1.000	1.000-5.000	100-1.000
≥13 anos	4.000-10.000	2.000-7.000	200– 1.000	1.000-3.000	20-500

Fonte: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2020.

6.5.1.2 Razão monócito-linfócito

A razão monócito linfócito (RML) é utilizada como um marcador de inflamação crônica. O cálculo do RML é definido pelo número absoluto de monócitos dividido pelo número absoluto de linfócitos, estes valores são obtidos através dos resultados encontrados no hemograma (Hesapcioglu *et al.*,2017).

6.5.1.3 Razão neutrófilo-linfócito

A razão neutrófilos linfócitos (RNL) é utilizada como um marcador de inflamação e tem sido amplamente estudado como um parâmetro preditivo e prognóstico em várias doenças psiquiátricas associadas a inflamação. Para se obter os valores desta razão calcula-se o valor da porcentagem de neutrófilos pela porcentagem de linfócitos (Nurmalia *et al.*, 2020).

6.5.2 Variáveis Independentes

6.5.2.1 *Children's Eating Behaviour Questionnaire (CEBQ) (Viana et al., 2008):*

Avalia o comportamento alimentar ou estilo alimentar das crianças e jovens através das respostas dadas pelos seus cuidadores. O questionário possui 35 itens e avalia o comportamento alimentar de acordo com algumas dimensões psicológicas, tais como: Resposta à saciedade, Ingestão lenta, Seletividade e Subingestão emocional consideradas em seu conjunto por “desinteresse pela comida”, já as subescalas Resposta à comida, Prazer em comer, Sobre ingestão emocional e Desejo de beber traduzem o “interesse pela comida” (Figura 5).

Exemplos de perguntas contidas no questionário são: “Se tivesse oportunidade o meu filho passaria a maior parte do tempo comendo” (RC), “O meu filho adora comer” (PC), “Se tivesse a oportunidade o meu filho passaria o dia bebendo continuamente (refrigerantes ou sucos adoçados)” (DB), “O meu filho come mais quando está ansioso” (SE), “O meu filho come menos quando está cansado” (SIE), “O meu filho fica cheio antes de terminar a refeição” (RS), “O meu filho come cada vez mais devagar ao longo da refeição” (IL) e “Perante novos alimentos o meu filho começa por recusá-los” (SL).

Os questionários serão aplicados por meio do entrevistador para que os pais ou responsáveis pelos participantes respondessem. As respostas são dadas de acordo com a escala de Lickert de 5 pontos que se referem à frequência com que ocorre o comportamento. A pontuação varia de 1 a 5: nunca (1), raramente (2), às vezes (3), frequentemente (4) e sempre (5).

Para o resultado soma-se a pontuação das perguntas pertencentes à mesma subescala, de forma que cada subescala apresentará um valor médio de pontuação.

Subescala	Explicação
Prazer em comer (PC)	Representa um interesse generalizado por comida. Capta a medida em que a criança encontra prazer e desejo em comer.
Resposta a comida (RC)	Mede a ingestão alimentar em resposta a estímulos externos dos alimentos. Representa um manifesto interesse em comer e o desejo de despender/dedicar tempo a comer.
Desejo de beber (DB)	Pretende identificar o desejo de beber, em especial bebidas açucaradas.
Sobre ingestão emocional (SE)	Representa uma ingestão alimentar aumentada em resposta a emoções negativas, como raiva e ansiedade.
Subingestão emocional (SIE)	Representa uma ingestão alimentar diminuída em resposta a emoções negativas, como ansiedade e raiva.
Resposta à saciedade (RS)	Representa o grau de autorregulação da quantidade de alimentos consumida por uma criança, baseado na própria sensação de saciedade.
Ingestão lenta (IL)	Mede a velocidade da ingestão alimentar durante uma refeição. Uma maior pontuação nesse item reflete um interesse gradualmente reduzido na refeição.
Seletividade (SL)	Reflete uma falta de interesse por comida e por experimentar novos alimentos (neofobia), resultando em uma alimentação pouco variada.

Figura 5. Quadro com a explicação das subescalas utilizadas no Children's Eating Behaviour Questionnaire (CEBQ).

6.5.2.2 Estado nutricional

O estado nutricional será avaliado por meio do escore z do Índice de Massa Corporal (IMC) para a idade. Todas as crianças e adolescentes participantes serão pesados e medidos usando roupas leves, descalças, com os braços caídos ao longo do corpo e olhando para frente. As medidas de peso (em quilogramas) e estatura (em metros) serão utilizadas para o cálculo do IMC e seu respectivo valor absoluto de escore z com base nas curvas da OMS de 2006 e 2007.

6.5.2.3 Dados sociodemográficos

As covariáveis idade em anos completos, sexo (feminino e masculino), cor da pele (branca, parda/mulata/morena/cabocla, negra, amarela/oriental, indígena), renda familiar (em reais), e uso de medicamentos coletadas no questionário geral aplicado na primeira entrevista do protocolo de atendimento.

6.5.3 Análises estatísticas

Os dados foram duplamente digitados no EpiData® versão 3.1, transferidos e deverão ser analisados no software Stata® versão 13.

Quanto as análises estatísticas consideram-se que o presente estudo encontra-se em fase de planejamento e em linhas gerais prevê: a descrição das células sanguíneas da série branca e suas proporções, descrição da amostra quanto as características sociodemográficas, clínicas e comportamentais. As análises consistirão em métodos estatísticos convencionais de comparação, teste *t* para análise entre médias e teste qui-quadrado para prevalências entre os grupos. O nível de significância estatístico adotado será $p < 0,05$.

7. Orçamento

Produto	Quantidade	Valor
Impressão	500 unidades	100,00
Caneta	10 unidades	20,00
Lápis	10 unidades	15,00
Borracha	5 unidades	7,50
Prancheta	2 unidades	10,00
Exame de Sangue	80 unidades	3.200,00
Total		3.352,50

Figura 6.Quadro do orçamento.

8. Cronograma

Atividades	2019					2020										2021												
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N
Atividades Acadêmicas																												
Créditos em disciplinas	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Exame de proficiência										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								
Docência orientada																			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Projeto de pesquisa																												
Revisão bibliográfica	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Treinamento dos entrevistadores			■	■	■	■	■																					
Coleta de dados	■	■	■	■	■	■	■															■	■	■	■	■	■	■
Qualificação do projeto													■	■	■													
Elaboração do banco de dados													■	■	■	■	■	■	■	■	■							
Análise dados																		■	■	■	■	■	■	■				
Redação artigo																						■	■	■	■			
Defesa da dissertação																										■	■	

Figura 7. Quadro do cronograma de execução do projeto de pesquisa.

Referências

- Abbas AK, Lichtman AH. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Saunders 2003.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. **Cells and tissues of adaptive immun system**. In: *Cellular and molecular immunology*. 6th ed, Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007.
- Allely, CS. Exploring the female autism phenotype of repetitive behaviours and restricted interests (RBRI) : a systematic PRISMA review' , **Advances in Autism**. 2019, 5, 3 ,171-186.
- Anderson, G.M., Jacobs-Stannard, A., Chawarska, K., Volkmar, F.R., Kliman, H.J. Placental trophoblast inclusions in autism spectrum disorder. *Biol. Psychiatry*. 2007, 61, 487–491.
- Association A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-V**. 5º. 2013. 948 ISBN 978-85-8271-088-3.
- Ashwood P, Wills S, Van de Water J. The immune response in autism: a new frontier for autism search . **J Leukoc Biol**. 2006; 80: 1-15.
- Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I., et al. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. **Brain Behav Immun**. 2011, 25: 40–45.
- Baio J., Wiggins L., Christensen DL, et al. Prevalência do espectro do autismo entre crianças de 8 anos - Autismo e Desenvolvimento Rede de Monitoramento de Deficiências, 11 sites, Estados Unidos, 2014. **MMWR Summit Surveill** 2018; 67 (Nº SS-6).
- Balta, S., Demirer, Z., Aparci, M., Yildirim, A. O.; Ozturk, C. The lymphocyte-monocyte ratio in clinical practice. **Journal of Clinical Pathology**. 2015, 69, 88–89.
- Bandini, LG., Anderson, SE., Curtin, C., et al. Food selectivity in children with autism spectrum disorders and typically developing children. **J Pediatr**. 2010; 157(2), 259-264.
- Beliaev, A. M., Angelo, N., Booth, M; Bergin, C. Evaluation of neutrophil-to-lymphocyte ratio as a potential biomarker for acute cholecystitis. **Journal of Surgical Research**. 2016, 29, 93–101.
- Bjørklund G, Saad K , Chirumbolo S., et al. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. **Acta Neurobiol Exp** 2016, 76: 257–268

Bölte, S., Girdler, S., & Marschik, P. B. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2018; 76(7), 1275–1297.

Bozzi, Y., Provenzano, G., Casarosa, S. Neurobiological bases of autism–epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. **European Journal of Neuroscience**, 2018, 47(6), 534-548.

Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK. et al. DNase expression allows the pathogen group A streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. **Curr Biol**. 2006; 16, 396–400.

Calder PC. Branched-chain amino acid and immunity. **J Nutr**. 2006;136: 288–293.

Careaga M, Rogers S, Hansen RL, Amaral DG, Van de Water J, Ashwood P. Immune endophenotypes in children with autism spectrum disorder. **Biol Psychiatry**. 2015. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.08.036.

Castro K, Faccioli LS, Baronio D., et al. Feeding behavior and dietary intake of male children and adolescents with autism spectrum disorder: A case-control study. **International Journal of Developmental Neuroscience**. 2016;53:68-74.

Cruvinel WM, Júnior DM, Araújo JAP., et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**. 2010;50(4):434-61.

Depino AM. Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. **Mol Cell Neurosci**. 2013, 53: 69–76.

Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. **Brain Behav Immun**. 2010, 24: 64–71.

Estes, ML., McAllister, AK. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. **Nat. Rev. Neurosci**. 2015, 16, 469-486.

Evans, EW., Must, A., Anderson, SE., et al. Dietary Patterns and Body Mass Index in Children with Autism and Typically Developing Children. **Res Autism Spectr Disord**.. 2012; 6(1), 399-405.

Failace, R. **Hemograma**. Artmed. Grupo A. 6. ed. 2015. ISBN:9788582712290.

Frye, RE., Casanova, MF., Fatemi, SH., Folsom, TD., Reutiman, TJ., Brown, GL., Edelson, SM., Slattery, JC., Adams, JB. Neuropathological mechanisms of seizures in autism spectrum disorder. **Front. Neurosci**. 2016, 10, 192.

Hall JE. **Guyton and Hall textbook of medical physiology**. 13th. Elsevier Health Sciences; 2015. ISBN: 978-1-4557-7005-2

Herndon AC, DiGiuseppi C, Johnson SL, et al. Does nutritional intake differ between children with autism spectrum disorders and children with typical development? **J Autism Dev Disord**. 2009; 39(2):212–22.

Hesapcioglu ST, Kasak M, Kurt ANC, Ceylan MF. High monocyte level and low lymphocyte to monocyte ratio in autism spectrum disorders, **International Journal of Developmental Disabilities**. 2017,10(45).

Hilton CL, Harper's JD, Kueker RH, Lang AR, Abbacchio AM, Todorov A, LaVesser PD. Sensory responsiveness as a predictor of social severity in children with high-functioning autism spectrum disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**. 2010, 40 (8), 937–945.

Hutterer GC, Sobolev N, Ehrlich GC, et al. Pre-treatment lymphocyte-monocyte ratio as a potential prognostic factor in a cohort of patients with urothelial carcinoma of the tract. **J Clin Pathol**. 2015; 68: 351–5.

Jeste, SS; Tuchman, R. Autism spectrum disorder and epilepsy: two sides of the same coin? **J. Child Neurol**. 2015, 30,1963-1971.

Jyonouchi H, Sun S, Itokazu N. Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. **Neuropsychobiology**. 2002, 46: 76–84

Jyonouchi H, Geng L. Associations between Monocyte and T Cell Cytokine Profiles in Autism Spectrum Disorders: Effects of Dysregulated Innate Immune Responses on Adaptive Responses to Recall Antigens in a Subset of ASD Children. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 24;20(19):4731.

Kulage KM, Smaldone AM, Cohn EG. How will DSM-5 affect autism diagnosis? A systematic literature review and meta-analysis. **J Autism Dev Disord** 2014;44:1918-32.

Kulaksizoglu S, Koparan C. High neutrophil to lymphocyte ratio and low mean platelet volume level in autism spectrum disorders. **Ann Med Res** 2019;26(10):2382-5.

Kutlu A, Cevher Binici N. Does increased neutrophil-lymphocyte ratio predict autism spectrum disorder? **Anadolu Psikiyatri Derg**. 2018; 19(6):607-614

Li, P., Yin, Y., Li, D., Woo Kim, S., & Wu, G. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**. 2007; 98(2), 237-252.

López-Cacho JM, Gallardo S, Posada M, Aguerri M, et al. Characterization of immune cell phenotypes in adults with autism spectrum disorders. **J Investig Med**. 2016. doi: 10.1136/jim-2016-000070.

Maenner MJ, Shaw KA, Baio J, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities

Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. **MMWR Summit Surveill** 2020; 69 (Nº SS-4).

Mazurek MO, Lu F, Symecko H, et al. A prospective study of the concordance of DSM-IV and DSM-5 diagnostic criteria for autism spectrum disorder. **J Autism Dev Disord** 2017;47:2783-94.

Mead J, Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. **Immunol Lett.** 2015, 163: 49–55.

Mello, AMSR de, Andrade, MA; Ho, H, Souza Dias, I de. **Retratos do autismo no Brasil.** 1.ed. 2013. 1-106 ISBN 978-85-66629-00-2.

Meltzer, A., Water, JV. The role of the immune system in autism spectrum disorder. **Neuropsychopharmacology.** 2017, 42, 284–298.

Mostafa GA, Al-Ayadhi LY. The relationship between the increased frequency of serum antineuronal antibodies and the severity of autism in children. **Eur J Paediatr Neurol.** 2012, 16: 464–468

Kamal Nor KN, Ghazali AH, Ismail J. Prevalence of Overweight and Obesity Among Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorder and Associated Risk Factors. **Frontiers in pediatrics.** 2019;7:38

Nurmalia PS , Yudianita K , Rafli Haiqal M. , Fadill Akba M. The Diagnostic Value of Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Diagnosis of Autism Spectrum Disorders Indonesian **Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory,** 2020 July, 26 (3) : 356 – 361.

Oliveira LML, Rocha APC, Silva JMA. Avaliação nutricional em pacientes hospitalizados: uma responsabilidade interdisciplinar. **Revista Saber Científico** 2008, 01(01):240-252.

Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. **Brain Behav Immun.** 2012; 26: 383–392.

Organização Mundial da Saúde, OMS. CID 10 – Classificação De Transtornos Mentais e de Comportamento: Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas. Porto Alegre: Artmed, 1993

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. **Lancet.** 2001; 357: 1777–89.

Pecorelli A, Cervellati F, Belmonte G, Montagner G, Waldon P, Hayek J, Gambari R, Valacchi G. Cytokines profile and peripheral blood mononuclear cell morphology in Rett and autistic patients. **Cytokine.** 2016, 77: 180–188.

Piras IS, Haapanen L, Napolioni V, Sacco R, Van de Water J, Persico AM. Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral

profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. **Brain Behav Immun.** 2014, 38: 91–99.

Rede de Monitoramento de Autismo e Deficiências do Desenvolvimento Vigilância 2000 investigadores principais; CDC. Prevalência de distúrbios do espectro do autismo - Autismo e deficiências de desenvolvimento Rede de Monitoramento, seis locais, Estados Unidos, 2000. **MMWR Surveill Summ** 2007; 56 (n. SS-1).

Rede de Monitoramento de Autismo e Deficiências do Desenvolvimento Ano de Vigilância 2002 Principais Pesquisadores; CDC. Prevalência de distúrbios do espectro do autismo - Autismo e deficiências de desenvolvimento Rede de Monitoramento, 14 locais, Estados Unidos, 2002. **MMWR Surveill Summ** 2007; 56 (n. SS-1).

Robinson, E. B., Neale, B. M., & Hyman, S. E. Genetic research in autism spectrum disorders. **Current Opinion in Pediatrics.** 2015; 27(6), 685–691.

Rocha NP, Fortes RC. Utilização da contagem total de linfócitos e albumina sérica como preditores do risco nutricional em pacientes cirúrgicos. **Com. Ciências Saúde.** 2013; 24(1): 51-64.

Romero, M., Aguilar, J. M., Del-Rey-Mejías, Á., Mayoral, F., Rapado, M., Peciña, M., Lara, J. P. Comorbilidades psiquiátricas en los trastornos del espectro autista: estudio comparativo entre los criterios DSM-IV-TR y DSM-5. **Int J Clin Health Psychol.** 2016, 16(3): 266-275.

Schmitt L, Heiss CJ, Campbell EE. A comparison of nutrient intake and eating behaviors of boys with and without autism. **Top Clin Nutr.** 2008; 23(1):23–31.

Sharp, W. G., Berry, R. C., McCracken, C., Nuhu, N. N., Marvel, E., Saulnier, C. A., et al .Feeding problems and nutrient intake in children with autism spectrum disorders: a metaanalysis and comprehensive review of the literature. **J Autism Dev Disord.** 2013; 43(9), 2159-2173.

Sociedade Brasileira de Pediatria. **Transtorno do Espectro do Autismo.** n.5, 2019.

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. **Valores de referência hematológicos para adultos e crianças.** 2020.

Semiz, M., Yildirim, O., Canan, F., Demir, S., Hasbek, E., Tuman, T. C., Kayka, N. and Tosun, M. Elevated neutrophil/ lymphocyte ratio in patients with schizophrenia. **Psychiatr Danub.** 2014, 26, 220–225.

Siemann JK, Veenstra-VanderWeele J, Wallace MT. Approaches to Understanding Multisensory Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. **Autism Res.** 2020,13(9):1430-1449.

Stevenson, R. A. et al. Evidence for diminished multisensory integration in autism spectrum disorders. **J Autism Dev Disord**. 2014, v. 44, n. 12, p. 3161-7. ISSN 0162-3257.

Stubbs, E. G., Crawford, M. L., Burger, D. R. and Vandembark, A. A. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. **Journal of Autism and Childhood Schizophrenia**. 1977, 7, 49–55.

Sweeten, T. L., Posey, D. J. and McDougle, C. J. High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. **American Journal of Psychiatry**. 2003, 160, 1691–1693.

Tortora G.J; Derrickson B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 14.ed. Grupo GEN, 2016. ISBN 9788527728867

Turri-Zanoni, M., Salzano, G., Lambertoni, A., Giovannardi, M., Karligkiotis, A., Battaglia, P., Castelnovo, P. Prognostic value of pretreatment peripheral blood markers in paranasal sinus cancer: Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratio. **Head Neck**, 2017, 39, 730–736.

Viana, V., Sinde, S. O comportamento alimentar em crianças: Estudo de validação de um questionário numa amostra portuguesa (CEBQ). **Análise Psicológica**. 2008, v. 26, p. 111-120. ISSN 0870-8231.

World Health Organization - Multicentre Growth Reference Study Group: WHO Child Growth Standards: Length/ height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva, World Health Organization, 2006. Available at: http://www.who.int/childgrowth/standards/technical_report/en/index.html

World Health Organization. Growth reference data for 5-19 years. 2007. Disponível em: http://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/index.html

Wu G, Fanzo J, Miller DD, et al. Production and supply of high-quality food protein for human consumption: sustainability, challenges, and innovations. **Ann N Y Acad Sci**. 2014;1321:1-19.

Yonk LJ, Warren RP, Burger RA, Cole P, Odell JD, Warren WL, White E, Singh VK. CD4+ helper T cell depression in autism. **Immunol Lett**. 1990, 25: 341–345

Zerbo O, Yoshida C, Grether JK, Van de Water J, Ashwood P, Delorenze GN, Hansen RL, Kharrazi M, Croen LA. Neonatal cytokines and chemokines and risk of autism spectrum disorder: the Early Markers for Autism (EMA) study: a case-control study. **J Neuroinflammation**. 2014,11: 113.

Zimmer, M. H., Hart, L. C., Manning-Courtney, P., Murray, D. S., Bing, N. M., & Summer, S. Food variety as a predictor of nutritional status among children with autism. **J Autism Dev Disord**. 2012; 42(4), 549-556.

Zuckerman, K. E. et al. Overweight and Obesity: Prevalence and Correlates in a Large Clinical Sample of Children with Autism Spectrum Disorder. **Journal of autism and developmental disorders**. 2014,v. 44, n. 7, p. 1708-1719, 2014. ISSN 0162-3257/1573-3432.

Apêndices

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

FACULDADE DE NUTRIÇÃO

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Concordo em participar do estudo “**INTERVENÇÃO NUTRICIONAL PERSONALIZADA PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: ESTUDO PROSPECTIVO DE DIAGNÓSTICO E PROPOSIÇÃO DE INTERVENÇÃO**”. Estou ciente de que estou sendo convidado a participar voluntariamente do estudo.

JUSTIFICATIVA: A nutrição é especialmente importante no espectro autista, visto que pode trazer melhorias relacionadas ao comportamento de irritabilidade e agressivo. Sendo assim, orientações nutricionais desenvolvidas com base no comportamento relacionado à alimentação e no entendimento sobre alimentação e bem-estar das crianças, por parte das famílias, podem contribuir para a melhora da saúde da criança ou adolescente com transtorno do espectro autista (TEA).

PROCEDIMENTOS: Fui informado de que o objetivo geral da pesquisa será “**Avaliar o efeito de intervenção nutricional baseada no paciente e fatores associados em crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro Autista, assistidos no Sistema Único de Saúde da região sul do Brasil**”. Estou ciente de que minha participação envolverá responder a questionários, em dias alternados, com duração aproximada de 30 minutos cada.

RISCOS E DESCONFORTO: Fui informado que os riscos são mínimos e dizem respeito ao desconforto no momento da coleta de sangue.

BENEFÍCIOS: O participante receberá seu diagnóstico nutricional, os resultados dos seus exames de sangue, uma orientação nutricional individualizada e, se necessário, será encaminhado para consulta ambulatorial nutricional. Além disso, os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA: Como já me foi dito, minha participação neste estudo será voluntária e poderei interrompê-la a qualquer momento.

DESPESAS: Eu não terei que pagar para participar da pesquisa e não receberei compensações financeiras.

CONFIDENCIALIDADE: As informações obtidas serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a participação. Em nenhum caso você ou seu filho (a) será identificado por outros. Você receberá uma cópia deste termo onde consta telefone/email do pesquisador principal e endereço da instituição, podendo tirar suas dúvidas sobre o estudo, e informações decorrentes dele a qualquer momento.

CONSENTIMENTO: Recebi claras explicações sobre o estudo, todas registradas neste formulário de consentimento. Os investigadores do estudo responderam e responderão, em qualquer etapa do estudo, a todas as minhas perguntas, até a minha completa satisfação. Portanto, estou de acordo em participar do estudo. Este Formulário de Consentimento Pré-Informado será assinado em duas vias por mim, sendo uma arquivada na instituição responsável pela pesquisa e outra entregue ao participante.

Nome do participante: _____

Nome do representante legal: _____

Vínculo do representante legal: _____

ASSINATURA: _____ DATA: ____ / ____ / ____

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O participante compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento. Tenho como compromisso utilizar os dados para a publicação de relatórios e artigos científicos referentes a essa pesquisa. Se o participante tiver alguma consideração ou dúvida sobre a pesquisa, pode entrar em contato com os pesquisadores na Faculdade de Nutrição/UFPEL – Rua Gomes Carneiro, nº 1– CEP: 96010-610, Pelotas/RS; Telefone:(53)3284 - 3830.

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL _____

APENDICE B- QUESTIONÁRIO GERAL

Protocolo de Atendimento Nutricional ao Autista - Entrevista 1 REGISTRO: _____

INFORMAÇÕES GERAIS	
ID: Número criança no Projeto: _____	Entrevista: ____ CodEntr: Código da entrevistadora: ____
IDNE Número prontuário Neuro: _____	IDPE: Número prontuário Pediatria: _____
3.	Data da entrevista: ____/____/____
4.	Nome da criança: (PREENCHER COM LETRAS GARRAFAS E MAIÚSCULAS) _____
5.	Sexo da criança: (1) Masculino (2) Feminino
<i>“Agora vamos começar nossa conversa sobre alguns dados gerais do(a) Sr(a) e do(a) <CRIANÇA>...”</i>	
6.	Qual o seu nome? (Nome do entrevistado) (PREENCHER COM LETRAS MAIÚSCULAS) _____
7.	Qual o seu vínculo com o(a) <CRIANÇA>? (1) Pai (3) Avó (4) Irmão/irmã (6) Mãe/pai adotiva (8) Outro 7.a Se outro, qual? (2) Mãe (4) Avô (5) Mãe/pai social (7) Cuidador(a)/babá
8.	Com quem o(a) <CRIANÇA> mora? (1) Pai (3) Mãe/Pai (7) Mãe/pai ADOTIVO (8) Outro. 8.b Se outro, qual? _____ (2) Mãe (4) Avó/Avô (6) Mãe/pai SOCIAL
9.	Qual o endereço do(a) <CRIANÇA>? 9. (1) Rua (2) Av. (3) Travessa 9.a. Nome: _____ 9.a.1 Número? _____ 9.b Qual é o tipo de residência? (1) Casa (2) Apartamento, Se Apartamento: 9.b.1 Bloco? ____ 9.b.2 Número? _____ 9.c Esta <casa/apartamento/outro> é: (1) Própria (2) Alugada (3) Posse (4) Empréstada (5) Outro → 9.c.1 Se outro, qual? _____ (7) NSI (9) IGN 9.d Qual é o bairro? _____ 9.e Qual é a cidade? _____ 9.f Sabe me dizer algum ponto de referência? _____
10.	Qual o número de telefone para contato sobre o(a) <CRIANÇA>? 10. Telefone 1: (DDD) ____ número: _____ 10.a.1 (Nome de quem é o telefone): _____; 10.a.2 vínculo com a criança: _____ 10.b Telefone 2: (DDD) ____ número: _____ 10.b.1 (Nome de quem é o telefone): _____; 10.b.2 vínculo com a criança: _____ 10.c Telefone 3: (DDD) ____ número: _____ 10.c.1 (Nome de quem é o telefone): _____; 10.c.2 vínculo com a criança: _____ 10.d Telefone 4: (DDD) ____ número: _____ 10.d.1 (Nome de quem é o telefone): _____; 10.d.2 vínculo com a criança: _____
<i>“Agora vamos falar sobre alguns dados gerais do(a) <CRIANÇA>”</i>	
11.	Na maior parte do tempo, quem é responsável pelo cuidado do(a) <CRIANÇA>? (1) Mãe (2) Outro → 11.a Se outro, Nome: _____ 11.b vínculo com a criança: _____
12.	Qual a data de nascimento do(a) <CRIANÇA>? ____/____/____
13.	Qual a idade do(a) <CRIANÇA>? ____ anos
14.	(Observado) Cor da pele da <CRIANÇA>
(1) Branca (5) Indígena (2) Parda/ mulata/ morena/ cabocla (6) Em branco (3) Negra (7) NSI	15. Como você classifica a cor da pele do(a) <CRIANÇA>? (LER as opções em negrito) (1) Branca (5) Indígena (2) Parda/ mulata/ morena/ cabocla (6) Em branco (3) Negra (7) NSI

(4) Amarela/oriental	(9) IGN	(4) Amarela/oriental	(9) IGN
“Agora vou perguntar algumas informações do nascimento do(a) <CRIANÇA> Você tem o carteirinha de nascimento ou de vacinas da <CRIANÇA>?”			
16.	Qual foi o peso ao nascer do(a) <CRIANÇA>? __ __ __ __ g (6666) Branco; (7777) NSI; (9999) IGN 16.a A informação foi coletada a partir do: (1) Cartão da Criança (2) Relato do entrevistado (3) Prontuário		
17.	Qual foi o comprimento ao nascer do(a) <CRIANÇA>? __ __ , __ cm (66,6) Branco; (77,7) NSI; (99,9) IGN 17.a A informação foi coletada a partir do: (1) Cartão da Criança (2) Relato do entrevistado (3) Prontuário		
18.	Qual foi a idade gestacional no dia do parto do(a) <CRIANÇA>? __ __ semanas __ dias (777) NSI (999) IGN 18.a A informação foi coletada a partir do: (1) Cartão da Criança (2) Relato do entrevistado (3) Prontuário		
19.	Qual foi o tipo de parto do <CRIANÇA>? (1)Vaginal (2) Cesária (3) Fórceps (7)NSI 19.a Qual foi o APGAR do(a) <CRIANÇA>? 1º __ __ 2º __ __ (77) NSI (99) IGN 19.b A informação foi coletada a partir do: (1) Cartão da Criança (2) Relato do entrevistado (3) Prontuário		
20.	Com que idade o(a) <CRIANÇA> recebeu o diagnóstico de TEA? __ __ anos 20.a __ __ meses (77) NSI		
21.	Além do autismo o(a) <CRIANÇA> possui outro problema de saúde informado pelo médico? (1) Não → Pular para questão 22 (2) Sim (7) NSI (9) IGN Se sim, qual? (Descrever cada diagnóstico por linha) 21.a. _____ 21.a.1. _____ 21.a.2. _____ 21.a.3. _____		
22.	O/A <CRIANÇA> está frequentando algum centro educacional e/ou escola regular? (1) Não (2) Sim, Se SIM, qual (Nome do Local)? (22.a) _____ 22.a.1: cidade: _____ (7) NSI; (9) IGN (22.b) _____ 22.b.1: cidade: _____		
“Agora vamos conversar um pouco sobre amamentação e alimentação no primeiro ano de vida”			
23.	O(A) <CRIANÇA> mamou no peito pelo menos uma vez? (1) Não, nunca → Pular para questão 24 (2) Sim (7) NSI (9) IGN 23.a Se sim(2) Até que idade mamou no peito? __ __ meses 23.a.1 __ __ dias (67 67) ainda mama (77 77) NSI (88 88) NSA 23.b Se ainda mama, até que idade pretende dar o peito? __ __ meses (76) enquanto a criança quiser (78) enquanto tiver leite (79) outro (88) NSA (99) IGN 23.c Até que idade mamou somente no peito <u>sem</u> receber água, chá, suco e outros leites? __ __ meses 23.c.1 __ __ dias 23.d Nos primeiros dias de vida, recebeu fórmula infantil no hospital? (1) Não (2) Sim 23.e Com que idade passou a receber outros tipos de leite que não o leite materno? __ __ meses 23.e.1 __ __ dias (77 se não recebe outro leite ou formula infantil e pule para 26) 23.f Quando passou a receber outros leites, qual foi o primeiro tipo de leite que começou a receber? → Pular para 24 (1) formula infantil (NAN) (2) leite de vaca (3) leite ninho ou em po (4) outro: _____		
BLOCO DA CRIANÇA QUE NÃO MAMOU			

24.	Por que não mamou no peito? Razão 1: ___ 24.a Razão 2: ___ 00 = Só razão 1 14= Não tinha leite 18= Prematuro/doente 88=NSA 11= Mãe não quis 15= foi adotado 19= Alguém aconselhou 99= IGN 12 = Nenê não quis 16= Mãe HIV 20= Dor, rachadura, infecção no seio 13= seio sem bico 17= Mãe doente 21= Outro
25.	Qual foi o tipo de leite que começou a receber sem ser o leite materno? (1) formula infantil (ex. NAN) (2) leite de vaca (3) leite ninho ou em po (4) outro: _____
26.	Com que idade passou a receber outros alimentos, como papas de frutas, papa salgada ou mingau? ___ meses 26.a ___ dias (77) NSI
“Agora vamos falar sobre questões relacionadas a alimentação atual do(a) <CRIANÇA>”	
27.	Tu consideras que o(a) <CRIANÇA> tem dificuldade com a alimentação? (1) Não (2) Sim (7) NSI (9) IGN
28.	O(A) <CRIANÇA> já recebeu alguma orientação específica de alimentação, como o que comer, o que não comer, tipos de alimentos, horários? (1) Não (2) Sim -> 28.a Se sim, de qual profissional/pessoa recebeu orientação? _____ (7) NSI (9) IGN
29.	No momento o(a) <CRIANÇA> está fazendo algum acompanhamento específico sobre alimentação? (1) Não (2) Sim → 29.a Se sim, desde quando? ___ mês 29.a.1 ___ ano que iniciou o acompanhamento 29.b Qual o profissional/pessoa orientou? _____ (7) NSI (9) IGN
“Agora vamos falar sobre o uso de medicamentos do(a) <CRIANÇA>”	
30.	O/A <CRIANÇA> utiliza algum medicamento atualmente? (1) Não → <i>Pular para a questão 31</i> (2) Sim (7) NSI (9) IGN Se sim: 30.a. Qual? _____ 30.a.1 Dosagem? _____ 30.a.2 Unidade: ___ (1) mg (2)g (3)gts (4)sachê (5)cp (6)mL (7=NSI; 8=NSA; 9=IGN) 30.a.3 Frequência? ___ vezes/dia (55=conforme necessidade 7=NSI; 8=NSA; 9=IGN) 30.b. Qual? _____ 30.b.1 Dosagem? _____ 30.b.2 Unidade: ___ (1) mg (2)g (3)gts (4)sachê (5)cp (6)mL (7=NSI; 8=NSA; 9=IGN) 30.b.3 Frequência? ___ vezes/dia (55= conforme necessidade 7 = NSI; 8 = NSA; 9 = IGN) 30.c. Qual? _____ 30.c.1 Dosagem? _____ 30.c.2 Unidade: ___ (1) mg (2)g (3)gts (4)sachê (5)cp (6)mL (7=NSI; 8=NSA; 9=IGN) 30.c.3 Frequência? ___ vezes/dia (55= conforme necessidade 7 = NSI; 8 = NSA; 9 = IGN) 30.d. Qual? _____ 30.d.1 Dosagem? _____ 30.d.2 Unidade: ___ (1) mg (2)g (3)gts (4)sachê (5)cp (6)mL (7=NSI; 8=NSA; 9=IGN) 30.d.3 Frequência? ___ vezes/dia (55= conforme necessidade 7 = NSI; 8 = NSA; 9 = IGN) 30.e. Qual? _____

	<p>30.e.1 Dosagem? _____</p> <p>30.e.2 Unidade: _____ (1) mg (2)g (3)gts (4)sachê (5)cp (6)mL (7=NSI; 8=NSA; 9=IGN)</p> <p>30.e.3 Frequência? _____ vezes/dia (55= conforme necessidade 7 = NSI; 8 = NSA; 9 = IGN)</p> <p>30.f. Qual? _____</p> <p>30.f.1 Dosagem? _____</p> <p>30.f.2 Unidade: _____ (1) mg (2)g (3)gts (4)sachê (5)cp (6)mL (7=NSI; 8=NSA; 9=IGN)</p> <p>30.f.3 Frequência? _____ vezes/dia (55= conforme necessidade; 7 = NSI; 8 = NSA; 9 = IGN)</p>
“Agora vamos falar sobre funcionamento intestinal do(a) <CRIANÇA>”	
31.	Em uma semana normal, quantos DIAS por semana o(a) <CRIANÇA> costuma fazer cocô? ____ (número de 0 a 7) (77) NSI (99) IGN
32.	Em uma semana normal, até quantos DIAS seguidos o(a) <CRIANÇA> costuma ficar SEM fazer cocô? ____ (número de 0 a 7) (77) NSI (99) IGN
33.	Em um dia normal, QUANTAS VEZES o(a) <CRIANÇA> costuma fazer cocô? ____ vezes (77) NSI (99) IGN
34.	Na maioria das vezes, como é a aparência das fezes do(a) <CRIANÇA>? (MOSTRAR A ESCALA DE BRISTOL) (0) Bolinhas bem duras, separadas como coquinhos (difíceis para sair) (1) Formato de linguiça encaroçada, com pequenas bolinhas grudadas (2) Formato de linguiça com rachaduras na superfície (3) Alongada com formato de salsicha ou cobra, lisa e macia (4) Pedacos macios e separados com bordas bem definidas (faceis de sair) (5) Massa pastosa e fofa com bordas irregulares (6) Totalmente líquida, sem pedaços sólidos (7) NSI (9) IGN
“Agora vamos falar sobre questões relacionadas ao sono do(a) <CRIANÇA>”	
35.	Quanto tempo o(a) <CRIANÇA> passa dormindo durante a NOITE, ou seja, entre 7 da noite e 7 da manhã? Horas: _____ (77) NSI (99) IGN 35.a Minutos: _____ (77) NSI (99) IGN
36.	Em média, quantas vezes o(a) <CRIANÇA> acorda por noite? _____ vezes (77) NSI (88) NSA (99) IGN
37.	Durante a noite, quanto tempo o(a) <CRIANÇA> permanece acordado(a)? Horas: _____ (77) NSI (99) IGN 37.a Minutos: _____ (77) NSI (99) IGN
38.	Quanto tempo o(a) <CRIANÇA> passa dormindo durante o DIA, ou seja, entre 7 da manhã e 7 da noite? Horas: _____ (7) NSI (9) IGN 38.a Minutos: _____ (7) NSI (9) IGN
SE O CUIDADOR NÃO FOR A MÃE: “Agora vamos falar sobre questões relacionadas a(o) Sr.(a) cuidador(a) ”	
39.	Qual a sua idade? _____ anos (88) NSA (99) IGN
40.	O(A) Sr.(a) frequentou a escola? (1) Não → <i>Pular para a questão 41</i> (2) Sim → 40.a Qual foi a última ano (série) que o(a) Sr(a) concluiu com aprovação? _____ anos do 40.b Grau (1) 1º (2) 2º graus, médio ou técnico (3) 3º, universidade (4) Pós-graduação (7) NSI (9) IGN
“Agora vamos falar sobre a mãe do(a) <CRIANÇA>”	
41.	Qual a idade da mãe do(a) <criança>? _____ anos (77) NSI (99) IGN
42.	A mãe do(a) <CRIANÇA> frequentou a escola? (1) Não (Pular para a questão 43) (2) Sim → 42.a Qual foi a última ano (série) que ela concluiu com aprovação? _____ anos do 40.b Grau (1) 1º (2) 2º graus, médio ou técnico (3) 3º, universidade (4) Pós-graduação (7) NSI (9) IGN
43.	A mãe do(a) <CRIANÇA> atualmente está trabalhando?

	(1) Não (2) Sim (7) NSI (9) IGN																												
44.	Qual a situação conjugal da mãe do(a) <CRIANÇA>? LER as opções (1) Vive com companheiro (5) Não tem namorado (2) Não vive com companheiro há mais de um ano (6) Outro. 44.a Se outro, qual? _____ (3) Não vive com companheiro há menos de um ano (7) NSI (4) Tem um namorado há mais de um ano (9) IGN																												
45.	O <CRIANÇA> possui outros irmãos? (1) Não (2) Sim. <i>Se sim: (PREENCHER O QUADRO ABAIXO)</i>																												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>“Qual as idades?”</th> <th>“Qual o sexo?”</th> <th>“Algum irmão(s) tem TEA?”</th> <th>“Possui outro problema de saúde mental que não o TEA?”</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>45.a.1 Idade: ___ anos</td> <td>45.b.1 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino</td> <td>45.c.1 TEA? (1) Não (2) Sim</td> <td>45.d.1 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.1 Se sim, qual? _____</td> </tr> <tr> <td>45.a.2 Idade: ___ anos</td> <td>45.b.2 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino</td> <td>45.c.2 TEA? (1) Não (2) Sim</td> <td>45.d.2 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.2 Se sim, qual? _____</td> </tr> <tr> <td>45.a.3 Idade: ___ anos</td> <td>45.b.3 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino</td> <td>45.c.3 TEA? (1) Não (2) Sim</td> <td>45.d.3 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.3 Se sim, qual? _____</td> </tr> <tr> <td>45.a.4 Idade: ___ anos</td> <td>45.b.4 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino</td> <td>45.c.4 TEA? (1) Não (2) Sim</td> <td>45.d.4 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.4 Se sim, qual? _____</td> </tr> <tr> <td>45.a.5 Idade: ___ anos</td> <td>45.b.5 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino</td> <td>45.c.5 TEA? (1) Não (2) Sim</td> <td>45.d.5 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.5 Se sim, qual? _____</td> </tr> <tr> <td>45.a.6 Idade: ___ anos</td> <td>45.b.6 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino</td> <td>45.c.6 TEA? (1) Não (2) Sim</td> <td>45.d.6 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.6 Se sim, qual? _____</td> </tr> </tbody> </table>	“Qual as idades?”	“Qual o sexo?”	“Algum irmão(s) tem TEA?”	“Possui outro problema de saúde mental que não o TEA?”	45.a.1 Idade: ___ anos	45.b.1 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.1 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.1 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.1 Se sim, qual? _____	45.a.2 Idade: ___ anos	45.b.2 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.2 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.2 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.2 Se sim, qual? _____	45.a.3 Idade: ___ anos	45.b.3 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.3 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.3 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.3 Se sim, qual? _____	45.a.4 Idade: ___ anos	45.b.4 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.4 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.4 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.4 Se sim, qual? _____	45.a.5 Idade: ___ anos	45.b.5 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.5 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.5 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.5 Se sim, qual? _____	45.a.6 Idade: ___ anos	45.b.6 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.6 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.6 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.6 Se sim, qual? _____
“Qual as idades?”	“Qual o sexo?”	“Algum irmão(s) tem TEA?”	“Possui outro problema de saúde mental que não o TEA?”																										
45.a.1 Idade: ___ anos	45.b.1 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.1 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.1 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.1 Se sim, qual? _____																										
45.a.2 Idade: ___ anos	45.b.2 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.2 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.2 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.2 Se sim, qual? _____																										
45.a.3 Idade: ___ anos	45.b.3 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.3 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.3 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.3 Se sim, qual? _____																										
45.a.4 Idade: ___ anos	45.b.4 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.4 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.4 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.4 Se sim, qual? _____																										
45.a.5 Idade: ___ anos	45.b.5 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.5 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.5 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.5 Se sim, qual? _____																										
45.a.6 Idade: ___ anos	45.b.6 Sexo: (1) Masculino (2) Feminino	45.c.6 TEA? (1) Não (2) Sim	45.d.6 Outro diagnóstico mental? (1) Não (2) Sim. 45.e.6 Se sim, qual? _____																										
46.	Algum outro familiar do(a) <CRIANÇA> (pai, mãe, tio, primo) têm diagnóstico de TEA identificado por médico? (1) Não (2) Sim (7) NSI (9) IGN 46.a Se sim, qual o parentesco com o(a) <CRIANÇA>? (1) Mãe (2) Pai (3) Tio (4) Primo (5) Outro 46.a.1 Qual? _____																												
“Agora vamos falar sobre questões relacionadas ao pai do(a) <CRIANÇA>”																													
47.	O pai biológico do/a <CRIANÇA> está vivo? (1) Não (2) Sim (7) NSI 47.b. Qual a idade do pai do(a) <criança>? ___ anos (77) NSI (99) IGN																												
48.	A/O <CRIANÇA> convive com o pai biológico? (1) Não (2) Sim → 48.a Com que frequência a <CRIANÇA> costuma ver o pai? ___ vezes 48.a.1 (1) Semana (2) Mês (3) Ano (44) Mora com o pai (7) NSI (8) NSA																												
49.	O pai do(a) <CRIANÇA> frequentou a escola? (1) Não → <i>Pular para a questão 50</i> (2) Sim → 49.a Qual foi a última ano (série) que ele concluiu com aprovação? ___ anos do 40.b Grau () 1º () 2º graus, médio ou técnico () 3º, universidade () Pós-graduação (7) NSI (9) IGN																												
50.	O pai do(a) <CRIANÇA> está trabalhando atualmente? (1) Não (2) Sim (7) NSI (8) NSA																												

“Agora vou lhe fazer algumas perguntas sobre a renda da família”	
51.	<p>A família recebe algum benefício como bolsa-família, Loas, auxílio-reclusão, seguro-desemprego ou pensão?</p> <p>(1) Não → <i>Pular para a questão 52</i></p> <p>(2) Sim → Se sim: 51.a Auxílio 1: Quanto? R\$ _____, ____ /mês (7777,77) NSI (8888,88) NSA (9999,99) IGN</p> <p style="padding-left: 40px;">51.b Auxílio 2: Quanto? R\$ _____, ____ /mês (7777,77) NSI (8888,88) NSA (9999,99) IGN</p> <p style="padding-left: 40px;">51.c Auxílio 3: Quanto? R\$ _____, ____ /mês (7777,77) NSI (8888,88) NSA (9999,99) IGN</p>
52.	<p>Quantas pessoas moram na mesma casa incluindo o(a) <CRIANÇA> ? ____ pessoas (77) NSI (99) IGN</p> <p>52.a Destas pessoas, quantas têm renda? ____ pessoas (77) NSI (88) NSA (99) IGN</p> <p>Qual a remuneração em Reais de cada uma dessas pessoas (NÃO considerar o valor do benefício)?</p> <p>52.b Contribuinte 1: _____ 52.b.1 R\$ _____, 00 (77777) NSI (88888) NSA (99999) IGN</p> <p>52.c Contribuinte 2: _____ 52.c.1 R\$ _____, 00 (77777) NSI (88888) NSA (99999) IGN</p> <p>52.d Contribuinte 3: _____ 52.d.1 R\$ _____, 00 (77777) NSI (88888) NSA (99999) IGN</p> <p>52.e Contribuinte 4: _____ 52.e.1 R\$ _____, 00 (77777) NSI (88888) NSA (99999) IGN</p>
Medida 1- “Agora gostaria de medir a altura e o peso do(a) <CRIANÇA>”	
Atenção: Para registrar a medida utilize a vírgula e a casa decimal. Não arredonde.	
53.	<p>CRIANÇA: Estatura: _____, ____ cm</p> <p>(666,6) Não quis aferir a estatura → 53.a Anote o motivo: _____</p>
54.	<p>CRIANÇA: Peso: _____, ____ g (<i>Anote o valor que aparecer no visor da balança</i>)</p> <p>(666,66) Não quis ser pesado → 54.a Anote o motivo: _____</p> <p>54.b Anote as roupas que o entrevistado está utilizando:</p> <p>_____</p>
Medida 2 – MÃE - “Agora gostaria de verificar a SUA altura e peso”	
Atenção: Para registrar a medida utilize a vírgula e a casa decimal. Não arredonde.	
55.	<p>MÃE: Estatura: _____, ____ cm (888,8) NSA</p> <p>(666,6) Não quis aferir a estatura → 57.a Anote o motivo: _____</p>
56.	<p>MÃE: Peso: _____, ____ g (<i>Anote o valor que aparecer no visor da balança</i>) (888,88) NSA</p> <p>(666,66) Não quis ser pesado → 56.a Anote o motivo: _____</p> <p>56.b Anote as roupas que o entrevistado está utilizando:</p> <p>_____</p>
Medida 3 – CUIDADOR - “Agora gostaria de verificar a SUA altura e peso”	
Atenção: Para registrar a medida utilize a vírgula e a casa decimal. Não arredonde.	
57.	<p>CUIDADOR: Estatura: _____, ____ cm (888,8) NSA</p> <p>(666,6) Não quis aferir a estatura → 57.a Anote o motivo: _____</p>
58.	<p>CUIDADOR: Peso: _____, ____ g (<i>Anote o valor que aparecer no visor da balança</i>) (888,88) NSA</p> <p>(666,66) Não quis ser pesado → 58.a Anote o motivo: _____</p> <p>58.b Anote as roupas que o entrevistado está utilizando:</p> <p>_____</p>

APENDICE C- VOUCHER



VOUCHER Nº _____

Registro: _____

Data: ____ / ____ / ____



Encaminhamento para realização de exame de sangue.

Laboratório NOVARAEndereço: Rua Félix da Cunha, 802 – Centro – Pelotas
Fone: (53) 3227-9100

Não é necessário **JEJUM**.
Leve um documento de identificação da criança.
(Certidão de nascimento ou identidade)

Paciente _____

Para realização do exame leve esse voucher.**VOUCHER**

Nº _____

Anexos

ANEXO A- CHILDREN'S EATING BEHAVIOUR QUESTIONNAIRE (CEBQ)**BLOCO I – Escala Children's Eating Behaviour Questionnaire (CEBQ)****RESPONSÁVEL**

Medida 1 – AGORA EU PRECISO POR FAVOR QUE O (A) SR/SRA RESPONDA AS PERGUNTAS A SEGUIR SOBRE O COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE SEU FILHO(A). IREI LER CADA ITEM SEPARADAMENTE E O(A) SR/SRA OLHANDO O CARTÃO RESPOSTA ME RESPONDA COM QUE FREQUÊNCIA O SEU FILHO SE COMPORTA DESSA FORMA, LEVANDO EM CONTA AQUILO QUE O SEU FILHO(A) FAZ NA MAIORIA DAS VEZES EM RELAÇÃO A ALIMENTAÇÃO. NÃO IMPORTA COMO SEU FILHO SE COMPORTA, CADA CRIANÇA TEM SUA FORMA DE AGIR EM RELACAO A ALIMETACAO.

01	O meu filho(a) adora comida.	1	2	3	4	5	EF
02	O meu filho(a) come mais quando anda preocupado(a).	1	2	3	4	5	EE O
03	O meu filho(a) tem um grande apetite.	1	2	3	4	5	SR
04	O meu filho(a) termina as refeições muito rapidamente.	1	2	3	4	5	SE
05	O meu filho(a) interessa-se por comida.	1	2	3	4	5	EF
06	O meu filho(a) anda sempre a pedir de beber (refrigerante ou sumos).	1	2	3	4	5	D D
07	Perante novos alimentos o meu filho(a) começa por recusa-los.	1	2	3	4	5	FF
08	O meu filho(a) come vagorosamente.	1	2	3	4	5	SE
09	O meu filho(a) come menos quando está zangado(a).	1	2	3	4	5	EE U
10	O meu filho(a) gosta de experimentar novos alimentos.	1	2	3	4	5	FF
11	O meu filho(a) come menos quando está cansado(a).	1	2	3	4	5	EE U
12	O meu filho(a) está sempre a pedir comida.	1	2	3	4	5	FR
13	O meu filho(a) come mais quando está aborrecido(a).	1	2	3	4	5	EE O
14	Se o deixassem o meu filho(a) comeria demais.	1	2	3	4	5	FR
15	O meu filho(a) come mais quando está ansioso(a).	1	2	3	4	5	EE O
16	O meu filho(a) gosta de uma grande variedade de alimentos.	1	2	3	4	5	FF
17	O meu filho(a) deixa comida no prato no fim das refeições.	1	2	3	4	5	SR
18	O meu filho(a) gasta mais que 30 minutos para terminar uma refeição.	1	2	3	4	5	SE
19	Se tivesse oportunidade o meu filho(a) passaria a maior parte do tempo a comer.	1	2	3	4	5	FR
20	O meu filho(a) está sempre à espera da hora das refeições.	1	2	3	4	5	EF
21	O meu filho(a) fica cheio(a) antes de terminar a refeição.	1	2	3	4	5	SR
22	O meu filho(a) adora comer.	1	2	3	4	5	EF
23	O meu filho(a) come mais quando está feliz.	1	2	3	4	5	EE O
24	O meu filho(a) é difícil de contentar com as refeições.	1	2	3	4	5	FF
25	O meu filho(a) come menos quando anda transtornado(a).	1	2	3	4	5	EE U
26	O meu filho(a) fica cheio muito facilmente.	1	2	3	4	5	SR
27	O meu filho(a) come mais quando não tem nada para fazer.	1	2	3	4	5	EE O
28	Mesmo se já está cheio meu filho(a) arranja espaço para comer um alimento preferido.	1	2	3	4	5	FR
29	Se tivesse a oportunidade o meu filho(a) passaria o dia a beber continuamente (refrigerante e sumos).	1	2	3	4	5	D D

30	O meu filho(a) é incapaz de comer a refeição se antes tiver comido alguma coisa.	1	2	3	4	5	SR
31	Se tivesse a oportunidade o meu filho(a) estaria sempre a tomar uma bebida (refrigerante ou sumos).	1	2	3	4	5	DD
32	O meu filho(a) interessa-se por experimentar alimentos que nunca provou antes.	1	2	3	4	5	FF
33	O meu filho(a) decide que não gosta de um alimento mesmo que nunca o tenha provado.	1	2	3	4	5	FF
34	Se tivesse a oportunidade o meu filho(a) estaria sempre com comida na boca.	1	2	3	4	5	FR
35	O meu filho(a) come cada vez mais devagar ao longo da refeição	1	2	3	4	5	SE

**ANEXO B- CHILDREN'S EATING BEHAVIOUR QUESTIONNAIRE (CEBQ)
(LISTA DE CHECAGEM DO QUESTIONÁRIO CEBQ)**

<u>Cartão CEBQ</u>	
1	Nunca
2	Raramente
3	Por vezes
4	Muitas vezes
5	Sempre/

Parte 2 – Relatório de Campo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Relatório do Trabalho de Campo

Células sanguíneas da série branca em crianças e adolescentes do espectro autista: proposta de estudo descritivo transversal.

Bárbara Peter Gonçalves

Pelotas, 2021

Sumário

1. Logística.....	79
2. Entrevistadores.....	80
3. Coleta de dados.....	80
3.1. Controle de qualidade dos dados.....	81
3.2. Digitação e processamento de dados.....	81
4. Perdas.....	82
5. Modificações do Projeto de Pesquisa.....	82

1. Logística

Os dados usados neste trabalho fazem parte do Projeto de Pesquisa PANA que iniciou em outubro de 2018 por duas mestrandas sob supervisão de duas docentes da Faculdade de Nutrição.

No entanto, a coleta de dados foi suspensa em março de 2020 devido a pandemia pelo Coronavírus (SARS-CoV-2), sendo iniciado neste período a assistência nutricional remota aos participantes do projeto por meio de consultas e esclarecimentos de dúvidas *on-line*. Para assistência remota foi criado um grupo no aplicativo de mensagens *Whatsapp* intitulado “PANA On-line para facilitar a comunicação e assistência. Em junho de 2021 as atividades presenciais foram retomadas possibilitando o retorno gradual da coleta de dados.

A equipe de trabalho do referido projeto é composta por duas professoras do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) Prof.^a Dra. Juliana dos Santos Vaz (coordenadora do projeto) e Prof.^a Dra. Sandra Costa Valle. O projeto contou, ainda, com o auxílio de uma bolsista de Iniciação Científica e com 3 alunas voluntárias (acadêmicas do curso de Nutrição da UFPel) e foi supervisionado por duas mestrandas do Programa de Pós-graduação em Alimentos (PPGNA) da UFPel, Bárbara Peter Gonçalves e Eduarda de Souza Silva, as quais coordenaram e realizaram as seguintes atividades:

- Revisão e ajuste dos instrumentos utilizados na coleta de dados;
- Impressão dos instrumentos;
- Elaboração de manuais para aplicação de instrumentos e digitação de dados coletados no *software* específico;
- Seleção e treinamento de alunas colaboradoras;
- Triagem dos participantes para o estudo;
- Agendamento das entrevistas;
- Aplicação dos questionários;
- Revisão e codificação dos questionários;
- Elaboração e formatação de banco de dados;
- Dupla digitação dos dados;
- Análise estatística dos dados;

- Assistência e orientação nutricional presencial e remota aos participantes do projeto.

Durante o período de trabalho de campo também foi apresentado resumo na 6ª e 7ª Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão da UFPel intitulados “Contagem total de linfócitos e ingestão proteica em crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro Autista: projeto de estudo transversal” e “Células sanguíneas da série branca em crianças e adolescentes com autismo” respectivamente. Também foi publicado um artigo na Revista Expressa Extensão intitulado “Projetos de extensão e pesquisa asseguram o cuidado nutricional de crianças com Transtorno do Espectro Autista no período de pandemia do Novo Coronavírus” relatando as ações desenvolvidas pelo projeto PANA durante o período de isolamento social causado pela epidemia do Coronavírus no ano de 2020.

2. Seleção e treinamento dos entrevistadores

Os dados foram obtidos por meio de entrevistas estruturadas realizadas por duas mestrandas do PPGNA da UFPel previamente treinadas. As demais colaboradoras receberam manual de instrução e treinamentos para a aplicação dos instrumentos usados neste trabalho.

O procedimento de coleta de amostra de sangue para o leucograma foi realizado em um laboratório de referência na cidade, com profissionais técnicos experientes, responsáveis e treinados para esse procedimento dentro das técnicas estabelecidas a fim de minimizar desconforto ao paciente.

Os pacientes em risco nutricional foram encaminhados para atendimento no ambulatório de pediatria da Famed/UFPel.

3. Coleta de dados

As variáveis de caracterização da amostra foram obtidas através de um questionário pré-estruturado (Apêndice B), respondido pelos pais ou responsáveis, contendo informações sobre as características sociodemográficas: escolaridade materna (anos); renda (reais); idade da criança/adolescentes (anos); sexo (masculino e feminino), cor da pele (branca e não branca), informações sobre a saúde da criança/adolescente: uso de

antipsicótico (sim ou não), sono (horas). O estado nutricional foi avaliado através do escore Z do índice de massa corporal para idade (IMC/I). O excesso de peso foi considerado a exposição principal.

A escala *Children's Eating Behaviour Questionnaire* (CEBQ) (Anexo A) foi respondida pelo principal responsável da criança, os quais foram orientados quanto a escala de variação de pontuação. Para auxiliar quanto a resposta da CEBQ as entrevistadoras utilizaram uma ficha (Anexo A) que ficava à disposição do entrevistado.

Para a análise do desfecho primário, a contagem do número absoluto e relativo de monócitos, os responsáveis receberam um voucher (Anexo C) com encaminhamento para realização do exame de sangue contemplando leucograma em um laboratório de análises clínicas de referência na cidade.

3.1 Controle de qualidade dos dados

A qualidade dos dados foi assegurada por um conjunto de medidas adotadas previamente ao trabalho de campo, como treinamentos para aplicação dos instrumentos, assim como elaboração de manual de instrução do Projeto PANA e dos questionários aplicados para o treinamento das alunas colaboradoras. As pesquisadoras realizaram reuniões periódicas com a equipe de pesquisa para acompanhamento do trabalho e esclarecimento de dúvidas relativas as etapas do protocolo de atendimento e preenchimento dos instrumentos.

Os questionários foram coletados, revisados e duplamente digitados. Após houve a validação dos dados digitados. Uma planilha para controle dos pacientes já entrevistados foi mantida no local de coleta, a fim de evitar questionários duplicados decorrentes de duas entradas de dados do mesmo indivíduo.

3.2 Digitação e processamento de dados

No momento de ingresso na pesquisa o participante era identificado por um código individual para ser usado no processamento dos dados.

Esta etapa foi realizada utilizando o software EpiData® versão 3.1, onde os dados foram duplamente digitados de forma cegada para posterior revisão e

correção de equívocos. Na sequência os dados foram transferidos e analisados no software Stata® versão 13.

4. Perdas

Foram considerados como perdas os participantes que após três tentativas de contato telefônico não realizaram a coleta de sangue no laboratório de análises clínicas vinculado a pesquisa e não retornaram para completar o protocolo da pesquisa.

5. Modificações do projeto de pesquisa

A estratégia de análise inicial deste trabalho visava investigar o número de células sanguíneas da série branca e as razões monócito/linfócito e neutrófilo/linfócito, segundo as características sociodemográficas, clínicas e comportamentais dos participantes. Contudo, ao aprofundar a revisão da literatura juntamente com as análises dos dados, não foram encontradas associações relevantes com as características investigadas e observou-se que estas razões possuem poucas evidências como marcadores inflamatórios, principalmente quando se procura investigar a sua relação com estado nutricional e comportamento de crianças e adolescentes com TEA. Portanto, o desfecho principal considerado foi o valor absoluto e relativo dos monócitos por apresentar uma relação significativa com a exposição primária o excesso de peso dos participantes.

Outra alteração deste projeto foi a mudança do cronograma de execução, devido a interrupção das atividades presenciais pela pandemia do Coronavírus (SARS-CoV-2). A coleta de dados foi suspensa em março de 2020, quando após organização do banco foram iniciadas as análises estatísticas. Em junho de 2021 a coleta de dados foi retomada, porém estes dados não foram acrescentados neste trabalho porque as análises dos resultados já haviam sido realizadas. Portanto, a defesa que inicialmente estava prevista para julho, foi prorrogada para novembro do mesmo ano.

Parte 3 - Manuscrito

Manuscrito elaborado de acordo com as normas do Jornal de Pediatria.

O aumento de monócitos está associado ao excesso de peso em crianças e adolescentes com desordem do espectro do autismo

Aumento dos monócitos associados ao excesso de peso no espectro do autismo

Bárbara P. Gonçalves^a, Eduarda de S. Silva^b, Josiane da C. Luçardo^c, Mayra P. Fernandes^d, Juliana dos S. Vaz^e, Sandra C. Valle^f.

a. Nutricionista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, barbarapeterg@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/9079841242006008>. Orcid: 0000-0002-2671-8120.

Contribuição no estudo: Participação na concepção, delineamento, aquisição de dados, análise e interpretação de dados e escrita do artigo.

b. Nutricionista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, 98silvaeduarda@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/0269867945412838>. Orcid: 0000-0002-7965-540X.

Contribuição no estudo: Participação na concepção, delineamento, aquisição de dados, análise e interpretação de dados e revisão da escrita do artigo.

c. Mestre em Nutrição e Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas, josilucardo@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/5873415744730794>. Orcid: 0000-0002-8208-0678.

Contribuição no estudo: Participação na concepção, delineamento, aquisição de dados.

- d. Mestre em Epidemiologia, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal de Pelotas; pfmayra@hotmail.com; <http://lattes.cnpq.br/6079888078032398>. Orcid: 0000-0001-9564-4674.

Contribuição no estudo: Participação no delineamento e análise de dados.

- e. Doutorado em Nutrição, Professora associada da Faculdade de Nutrição na Universidade Federal de Pelotas, juliana.vaz@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/5991995630527653>. Orcid: 0000-0002-2880-767X.

Contribuição no estudo: Na concepção e delineamento do estudo, revisão crítica do conteúdo intelectual relevante e aprovação final da versão a ser submetida.

- f. Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia, Professora da Faculdade de Nutrição na Universidade Federal de Pelotas, sandracostavalle@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/3126369067313569>. Orcid: 0000-0003-1176-7402.

Contribuição no estudo: Na concepção e delineamento do estudo, análise e interpretação de dados, revisão crítica do conteúdo intelectual relevante e aprovação final da versão a ser submetida.

Conflitos de Interesse:

Nada a declarar.

Fonte financiadora do projeto:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Autor correspondente:

Bárbara Peter Gonçalves – Rua Gomes Carneiro, 01, Centro, Pelotas- RS, Brasil, CEP

96010-610 Tel (53) 32843835 E-mail: barbarapeterg@gmail.com

Contagem de Palavras:

* Contagem total das palavras do texto (excluindo resumo, tabelas, legendas e referencias): 2432

* Contagem total das palavras do Resumo: 208

* Número de Tabelas e Figuras: 4

Resumo

Objetivo: Investigar a contagem de monócitos e sua associação com o excesso de peso em crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro do Autismo (TEA).

Métodos: Estudo transversal conduzido de outubro de 2018 a março de 2020 em um Núcleo de Neurodesenvolvimento no Sul do Brasil. Foram avaliados 68 pacientes com TEA, de 3 a 18 anos. O número de monócitos foi medido em amostra de sangue, o IMC para idade $>+1$ escore-z conforme as curvas da OMS. Foi aplicado aos cuidadores principais a escala sobre o comportamento alimentar das crianças e um questionário padrão para coletar dados sociodemográficos e clínicos. A regressão linear foi utilizada para testar a associação entre o excesso de peso e a contagem de monócitos.

Resultados: A média de idade foi $8,6 \pm 3,3$ anos. Setenta e nove por cento era do sexo masculino, e 66% tinha excesso de peso. O número de monócitos foi maior naqueles com excesso de peso e com pontuação acima da média na subescala “sobre ingestão emocional”. Na regressão sem ajuste, o excesso de peso estava associado a monócitos elevados em comparação com os sem excesso de peso (B 64,0; 95% CI 13,9 - 114,1; β 0,30, $p=0,01$). Esta associação permaneceu significativa após ajuste para a subescala de "sobre ingestão emocional" (B 37,0; 95% CI 17,1 - 91,3; β 0,29; $p=0,02$). A variabilidade na contagem de monócitos atribuída ao excesso de peso foi de 14%.

Conclusão: Crianças e adolescentes com TEA apresentaram elevação da contagem de monócitos associada ao excesso de peso. Uma intervenção nutricional para controle do peso e da qualidade nutricional da dieta pode mitigar o impacto negativo sobre a atividade inflamatória e a disfunção imunológica nestes pacientes.

Palavras chave: transtorno do espectro do autismo, monócitos, excesso de peso, comportamento alimentar..

Abstract

Objective: To investigate the monocyte count and its association with overweight in children and adolescents with autism spectrum disorder (ASD).

Methods: Cross-sectional analysis of 68 patients, aged 3 to 18-year-old, conducted in a Neurodevelopmental Center in the south of Brazil. The number of monocytes (mm^3) was determined in blood samples. Overweight was defined as BMI-for-age $>+1$ z-score relative to WHO standards. Children's Eating Behaviour Questionnaire and a standard questionnaire to collect sociodemographic and clinical characteristics were applied to caregivers. Comparisons between sociodemographic, clinical, and eating behavior variables were performed with parametric tests. Linear regression was used to test the association between overweight and monocyte count.

Results: Mean age was 8.6 ± 3.3 years. Seventy-nine per cent were males, and 66% were overweight. In unadjusted regression, overweight was associated with higher monocytes compared to those non-overweight (B 64.0; 95% CI 13.9 – 114.1; β 0.30, $p=0.01$). This association remained significant after adjustment for the subscale of “emotional overeating” (B 37.0; 95% CI 17.1 – 91.3; β 0.29; $p=0.02$). The variability in monocyte count attributed to overweight was 14%.

Conclusions: Children and adolescents with ASD and showed elevated monocyte counts associated with overweight. Nutritional intervention to control overweight is essential to mitigate the negative impact on inflammatory activity and immune dysfunction in these patients.

Key words: autism spectrum disorder, monocytes, overweight, eating behavior.

Introdução

O transtorno do espectro do autismo (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento, caracterizada por comprometimento na comunicação social e comportamento restritivo e repetitivo de interesses¹. Estima-se que 1% da população global tenha TEA, com base nessa projeção o Brasil deve ter cerca de 2 milhões de crianças com autismo, porém não há dados oficiais no país².

A etiologia do TEA inclui uma herança multifatorial associada a fatores de risco ambientais, biológicos e genéticos em uma combinação de característica aditiva^{3,4}. A inflamação, a disfunção imunológica e a interação entre estes fatores tem sido relacionadas tanto à etiologia quanto à gravidade dos sintomas, sendo observadas desde a fase fetal e em diferentes estágios do ciclo de vida em indivíduos com autismo⁵⁻⁷.

Estudos mostram que crianças e adolescentes com TEA apresentam maior nível de citocinas pró-inflamatórias e uma resposta imune caracterizada por predomínio de monócitos no leucograma. Essas evidências indicam um estado inflamatório crônico, em particular naqueles com maior prejuízo comportamental⁴⁻⁹.

Sabe-se que o excesso de peso é um fator independente associado ao aumento da atividade inflamatória e a disfunção imunológica¹⁰⁻¹⁵. O excesso de peso é um distúrbio nutricional encontrado em elevada prevalência em crianças e adolescentes com TEA quando comparado àqueles com desenvolvimento típico^{10,11,13,15,16}. Além disso, estudos tem observado que esses pacientes apresentam maior prazer ao comer e apresentam menor capacidade de resposta à saciedade¹⁶ e tendem a se alimentar para lidar com diferentes estados emocionais de alegria, ansiedade e estresse^{10,11}.

Uma das vias de investigação do sistema imunológico é a análise das células sanguíneas da série branca, especialmente dos monócitos, por meio do hemograma, um exame de sangue de baixo custo e complexidade^{6,8}. Contudo, poucos estudos destinam-

se a avaliar a resposta imunológica por meio dessas células em indivíduos com autismo, especialmente na presença de condições que os predispõem ao aumento da atividade inflamatória. No presente estudo, nosso objetivo foi investigar as possíveis relações entre o excesso de peso e a contagem de monócitos em crianças e adolescentes com TEA. Segundo o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo do estado nutricional e do sistema imunológico neste grupo de pacientes.

Metodologia

Estudo transversal realizado no Núcleo de Neurodesenvolvimento da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. O rastreamento de pacientes foi realizado de outubro de 2018 a março de 2020. Foram convidados a participar do estudo pacientes que tinham diagnóstico de TEA que apresentaram os seguintes critérios de inclusão: i) entre 3 e 18 anos; ii) ausência de diagnóstico médico de síndrome genética, neuropatia e cardiopatia congênita.

Noventa e sete pacientes foram elegíveis e destes todos os responsáveis manifestaram interesse em participar da pesquisa. Vinte e dois pacientes não realizaram a coleta de sangue por apresentarem dificuldade na sua realização e 7 não preencheram a escala *Children's Eating Behaviour Questionnaire* (CEBQ), representando uma perda de 30%. Além disso, a presença de qualquer alergia, neoplasia ou infecção no momento da coleta de amostra de sangue foi considerada perda no presente estudo, mas nenhum destes casos foi relatado. Um total de 68 pacientes foram incluídos no presente estudo.

Todos os pacientes captados foram agendados para atendimento ambulatorial específico para o protocolo da pesquisa. A aplicação do questionário, escala e antropometria foi conduzida por nutricionistas previamente treinados e padronizados para o estudo. As entrevistas foram conduzidas com a presença do principal responsável pelos

cuidados do paciente, identificado segundo seu tempo destinado a permanecer com a criança ou adolescente. Na maioria dos casos, o responsável pela criança foi a mãe.

O desfecho estudado foi o número de monócitos. Para isso uma amostra de 5mL de sangue foi obtida em jejum, em laboratório de análises clínicas por meio de punção venosa. A análise do hemograma foi realizada por impedância elétrica, pelo princípio Coulter, obedecendo as instruções estabelecidas pelo fabricante do equipamento (Mindray®, China). O resultado foi expresso como número de monócitos por milímetro cúbico (mm^3). O resultado do leucograma foi expresso como um valor absoluto de cada tipo de leucócitos (neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos) de sangue e um valor relativo considerando a contagem total de leucócitos como referência (100%).

A exposição foi o excesso de peso, avaliado segundo IMC para idade em escore-z, tal como proposta pela OMS em 2006 e 2007¹⁷. Para avaliação antropométrica os pacientes foram pesados com roupas leves, em balança digital (TRENTIN®, Brasil) com capacidade de 150 kg e precisão de 100 g. A estatura foi obtida com estadiômetro vertical acoplado à balança com 213 cm e precisão de 0,1 cm. Os programas Anthro® e Anthro Plus® foram utilizados para calcular o z-score. Os indivíduos com IMC $>+1$ z-score foram considerados com excesso de peso.

O comportamento alimentar foi avaliado utilizando o Questionário do Comportamento Alimentar (CEBQ), traduzida e validada para a língua portuguesa¹⁸. Esta é uma escala subjetiva que foi respondida pelo cuidador principal. A escala possui 35 perguntas, divididas em oito subescalas, que se dividem em dois domínios: I) comportamentos que refletem “interesse pela comida”, composto pelas subescalas: a) prazer de comer, b) resposta à comida, c) desejo de beber e d) sobre ingestão emocional; e domínio II) comportamentos de “desinteresse pela comida”, composta pelas subescalas: a) sub ingestão emocional, b) resposta à saciedade, c) ingestão lenta e d)

seletividade. Os questionários foram respondidos com respostas de uma escala *Likert* de cinco pontos, conforme a frequência com que estas apresentam cada comportamento. A pontuação do instrumento varia de 1 a 5: nunca (1), raramente (2), às vezes (3), frequentemente (4) e sempre (5). Posteriormente, a pontuação das perguntas pertencentes à mesma subescala foram somadas, obtendo-se o valor médio e desvio padrão (DP) para cada uma. Este resultado foi utilizado dicotomicamente nas análises (inferior à média/igual ou superior à média).

As covariáveis sociodemográficas e clínicas utilizadas para descrever a amostra foram: a escolaridade da mãe, obtida em anos completos e categorizada em ≤ 8 e ≥ 9 anos de estudo; a renda familiar total coletada de forma contínua em reais (R\$) e categorizada em < 1 e ≥ 1 salário mínimo. A variável idade da criança foi coletada em anos e posteriormente categorizada nas seguintes faixas: ≤ 5 , 6 a 10 e ≥ 11 anos, o sexo foi categorizado em masculino ou feminino e a cor da pele em branca ou não branca. Os medicamentos em uso foram coletados de forma aberta e após categorizado em sim ou não para o uso de qualquer medicação antipsicótica. O tempo de sono foi coletado em horas e minutos e categorizado em < 7 e ≥ 7 horas/dia.

Os dados coletados foram duplamente digitados no software EpiData® (EpiData®, versão 3.1; The EpiData Associação Odense, Dinamarca, 2003-2005). Os dois conjuntos de dados introduzidos foram comparados e qualquer inconsistência foi resolvida através da verificação do questionário em papel. Foram efetuadas análises estatísticas no pacote estatístico Stata® (Stata Statistical Software, versão 13. College Station, TX, EUA). As análises descritivas são apresentadas como média, desvio padrão para as variáveis contínuas, e como proporções para as variáveis categóricas. A distribuição das variáveis foi avaliada utilizando o teste de Shapiro Wilk, uma vez que o resultado principal seguiu uma distribuição simétrica. A comparação entre duas

categorias foi realizada utilizando o teste t de Student, e três ou mais categorias foram realizadas utilizando a ANOVA One Way. O valor absoluto da contagem total e diferencial de leucócitos foi estratificado por faixa etária e comparado ao valor médio de referência de acordo com a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas¹⁹, por teste de t de *Student* para uma amostra.

A regressão linear foi utilizada para investigar a associação entre o excesso de peso e a contagem de monócitos. Para tanto realizou-se o teste de significância global e uma vez que o valor F foi significativo, passou-se para a segunda etapa com os testes de significância individuais. Cada subescala de comportamento alimentar da CEBQ, dados sociodemográficos e clínicos, como as variações descritas acima, foram potencialmente considerados sendo introduzidos nos modelos ajustados. No entanto, no modelo de regressão final foi mantido no modelo apenas a "sobre ingestão emocional", uma vez que o seu valor β era $>0,2$ e $p < 0,05$. O valor R^2 ajustado foi utilizado para prever a variabilidade da contagem de monócitos atribuída ao excesso de peso, ajustado para "sobre ingestão emocional". O nível de significância estatística foi fixado em $p < 0,05$.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, sob protocolo nº 2.835.793. O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido em duas vias, assinado pelos responsáveis das crianças e adolescentes.

Resultados

Os participantes do estudo tinham em média $8,6 \pm 3,3$ anos de idade. A maioria era do sexo masculino (79%), de cor da pele branca (76%). A maior parte das mães (61%) tinham nove ou mais anos de estudo e renda familiar maior que um salário mínimo (70%). A maioria das crianças e adolescentes dormia mais de 7 horas por dia (84%) e utilizava

fármaco antipsicótico (62%). Quanto ao estado nutricional a maior parte apresentava excesso de peso (66%). A média do número de monócitos foi estatisticamente maior nos pacientes com excesso de peso ($522\pm 211/\text{mm}^3$) quando comparada a dos pacientes sem excesso de peso ($394\pm 142/\text{mm}^3$) (Tabela 1).

A média da contagem de leucócitos totais e de leucócitos neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos foi de 8.857; 4.483; 485; 3.422 e 377 ($/\text{mm}^3$), respectivamente (Tabela suplementar 1), sendo que estas contagens não diferiram estatisticamente daquelas utilizadas como referência conforme idade e sexo¹⁹ (Dados não apresentados).

As subescalas CEBQ para prazer em comer, resposta à comida, desejo de beber, sobre ingestão emocional, sub ingestão emocional, resposta à saciedade, ingestão lenta e seletividade mostraram médias de 3,5; 3,07; 3,07; 2,73; 2,57; 2,70; 2,48; 2,89, respectivamente. O número de monócitos foi estatisticamente maior nos pacientes com pontuação acima da média nas subescalas “resposta à comida” (552 ± 232 vs 420 ± 137) e na “sobre ingestão emocional” (581 ± 247 vs 452 ± 126), em comparação com aqueles com pontuações abaixo da média nestas duas subescalas. Quanto a “sub ingestão emocional” (538 ± 218 vs 430 ± 161) e “ingestão lenta” (536 ± 214 vs 428 ± 165) o número de monócitos foi mais elevada entre os pacientes com pontuação abaixo da média em comparação aos acima da média (Tabela 2).

Na regressão linear não ajustada, a contagem de monócitos foi maior nos pacientes com excesso de peso (64.0; IC 95% 13.9 – 114.1; β 0.30, $p=0.01$), em comparação com os pacientes sem excesso de peso. Este resultado foi mantido significativo mesmo após o ajuste para a subescala “sobre ingestão emocional” (B 37.0; IC 95% 17.1 – 91.3; β 0.29; $p=0.02$) (Tabela 3). A variabilidade da contagem de monócitos atribuída ao excesso de peso foi de 14% após o ajuste para a sobre ingestão emocional (Tabela 3).

Discussão

Este estudo observou que crianças e adolescentes com TEA tem aumento do número de monócitos associados ao estado nutricional. Nesses pacientes o excesso de peso explicou significativamente o aumento do número de monócitos. Compreender essa relação é fundamental, uma vez que fatores de risco modificáveis, tais como a alimentação e do excesso de peso podem ser controlados e até mesmo mitigarem a resposta inflamatória mediada por monócitos em pacientes com TEA. Além disso, a presença de excesso de peso explica 14% da variabilidade do número de monócitos (Figura 1). Outros estudos também encontraram um maior número de monócitos em crianças neurotípicas com excesso de peso, demonstrando a relação entre o estado inflamatório de baixo grau e o excesso de peso^{11,20,21}. Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a descrever o impacto do excesso de peso na contagem elevada de monócitos em indivíduos com TEA.

Os monócitos são um tipo de leucócito, originários da medula óssea, encontrados no sangue e nos tecidos, que fazem parte da resposta imunológica inata e adaptativa regulando diretamente a produção de citocinas inflamatórias como as interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α)^{22,23}. O aumento dos monócitos contribui para a fagocitose de substâncias estranhas ao organismo e para a produção de citocinas que recrutam outras células inflamatórias^{6,24}.

A elevação do número de monócitos desempenha um papel central na resposta inflamatória subjacente a diversas doenças e agravos a saúde, relacionando-se a um processo cronicamente estabelecido¹¹. Pesquisas indicam uma maior contagem de monócitos em crianças e adolescentes com TEA comparadas às neurotípicas, além disso a elevação destas células se associou a um maior prejuízo comportamental no autismo^{6,25,26}.

Estudos têm apontado que o comportamento alimentar de indivíduos com TEA pode ser exacerbado, comparado ao de crianças neurotípicas, especialmente se considerarmos que entre as comorbidades mais frequentes está a compulsão^{10,16,27}. Além disso, a amplitude da gravidade dos sintomas no espectro do autismo são determinantes relevantes do comportamento, inclusive o alimentar⁹. *A priori*, a sobre ingestão emocional pode ser reflexo do prejuízo no comportamento, mediado pelo processo inflamatório estabelecido desde as fases iniciais do desenvolvimento no TEA. Entretanto, pode relacionar-se a hábitos alimentares inadequados, formados por um conjunto de influências genéticas e ambientais, e ao comportamento alimentar adquirido desde os primeiros anos de vida^{5,6,26,27}.

As crianças e adolescentes com TEA têm o hábito de ingerirem frequentemente bebidas açucaradas ao longo do dia²⁸, além de se alimentarem mais rapidamente, tendendo a preferir por refeições não saudáveis, como observado em estudos que retrataram a alta frequência de alimentos como os embutidos, *snacks* e biscoitos²⁸. Assim a maior dificuldade de lidar com o estado emocional combinada a uma alimentação densamente calórica e insuficiente em micronutrientes são fatores fortemente associados ao excesso de peso nesses indivíduos^{10,16,28,29}.

O estado inflamatório crônico de baixo grau, decorrente do aumento sistêmico de adipocinas também é encontrado em indivíduos com excesso de peso^{12,14}. O aumento tecido adiposo branco produz adipocinas que ao atingirem outros tecidos recrutam e estimulam a ativação das células do sistema imunológico, dentre elas os monócitos^{20,24}. Estes migram para o tecido adiposo, onde amadurecem em macrófagos, exacerbando a produção e secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6^{12,24}.

A combinação do aumento da adiposidade, uma maior ingestão emocional, e aumento da resposta inflamatória são aspectos que comprometem sobremaneira a saúde

de crianças e adolescentes com TEA em curto e longo prazo^{10,11,16}. Em especial ao considerar-se que a inflamação de baixo grau é a condição subjacente relacionada a diversas doenças, a exemplo de diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica e câncer¹².

No presente estudo, o perfil geral das células sanguíneas da série branca foi estratificado por idade e mostrou-se similar ao da população de referência¹⁹, e apesar da elevação significativa de monócitos não se observou monocitose (≥ 1000 células/ mm³) (Tabela suplementar 1). A contagem de linfócitos apresentou uma relação estatisticamente significativa com a idade, onde o número desta célula foi menor nas maiores categorias de idade (dados não apresentados). Este resultado foi atribuído a um fenômeno fisiológico devido a maturação de células imunes conforme a idade³⁰.

O presente trabalho apresenta algumas limitações que devem ser consideradas ao interpretar os resultados. Em primeiro lugar, refere-se à falta de informação sobre a gravidade dos sintomas do TEA. Segundo, refere-se à perda de pacientes devido à dificuldade na coleta de sangue. Em terceiro lugar, refere-se ao possível enviesamento do principal cuidador na interpretação do comportamento apresentado pela criança ou adolescente, embora estes sejam a melhor fonte de informação para a coleta de dados. Os pontos fortes do estudo incluem a sua validade interna através do rigor metodológico na seleção dos pacientes, a aplicação de instrumentos padronizados, uma equipa treinada e a utilização de um marcador biológico da resposta imune. Estes aspectos são relevantes para comparar os resultados com grupos populacionais semelhantes aos do presente estudo.

Conclusão

O excesso de peso está associado a uma maior contagem de monócitos em crianças e adolescentes com TEA. Uma intervenção nutricional é necessária para controlar o excesso de peso e o comportamento alimentar para prevenir futuros problemas de saúde relacionados à inflamação neste grupo.

Agradecimentos

Agradeço a Dra. Juliana Maia e Dra. Luiza Magalhães do Núcleo de Neurodesenvolvimento da Universidade Federal de Pelotas pelo apoio e incentivo para a realização desse estudo e ao Laboratório Novara pela parceria na coleta das amostras de sangue e na realização dos exames.

Referências

- [1] Association AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5). American Psychiatric Pub; 2013. 1505 p.
- [2] Maenner MJ, Shaw KA, Baio J, EdS1, Washington A, Patrick M, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR Surveill Summ.* 27 de março de 2020;69(4):1–12.
- [3] Depino AM. Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. *Mol Cell Neurosci.* março de 2013;53:69–76.
- [4] Harville T, Rhodes-Clark B, Bennuri SC, Delhey L, Slattery J, Tippet M, et al. Inheritance of HLA-Cw7 Associated With Autism Spectrum Disorder (ASD). *Front Psychiatry.* 2019;10:612.
- [5] Careaga M, Rogers S, Hansen RL, Amaral DG, Van de Water J, Ashwood P. Immune Endophenotypes in Children With Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry.* março de 2017;81(5):434–41.
- [6] Tural Hesapcioglu S, Kasak M, Cıtaç Kurt AN, Ceylan MF. High monocyte level and low lymphocyte to monocyte ratio in autism spectrum disorders. *Int J Dev Disabil.* 15 de março de 2019;65(2):73–81.
- [7] De Luca C, Colangelo AM, Alberghina L, Papa M. Neuro-Immune Hemostasis: Homeostasis and Diseases in the Central Nervous System. *Front Cell Neurosci.* 26 de novembro de 2018;12:459.
- [8] Kulaksizoglu S, Koparan C. High neutrophil to lymphocyte ratio and low mean platelet volume level in autism spectrum disorders. *Ann Med Res.* 2019;26(10):2382–5.
- [9] Marchezan J, dos Santos EGAW, Deckmann I, dos Santos Riesgo R. Immunological dysfunction in autism spectrum disorder: A potential target for therapy. *Neuroimmunomodulation.* 2018;25(5–6):300–19.
- [10] Kamal Nor N, Ghozali AH, Ismail J. Prevalence of Overweight and Obesity Among Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorder and Associated Risk Factors. *Front Pediatr.* 20 de fevereiro de 2019;7:38.
- [11] Gállego-Suárez C, Bulan A, Hirschfeld E, Wachowiak P, Abrishami S, Griffin C, et al. Enhanced Myeloid Leukocytes in Obese Children and Adolescents at Risk for Metabolic Impairment. *Front Endocrinol.* 27 de maio de 2020;11:327.
- [12] Apostolopoulos V, de Courten MPJ, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, de Courten B. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol Nutr Food Res.* janeiro de 2016;60(1):43–57.
- [13] Granich J, Lin A, Hunt A, Wray J, Dass A, Whitehouse AJ. Obesity and associated factors in youth with an autism spectrum disorder. *Autism.* novembro de 2016;20(8):916–26.

- [14] Kelishadi R, Roufarshbaf M, Soheili S, Payghambarzadeh F, Masjedi M. Association of Childhood Obesity and the Immune System: A Systematic Review of Reviews. *Child Obes.* agosto de 2017;13(4):332–46.
- [15] Healy S, Aigner CJ, Haegele JA. Prevalence of overweight and obesity among US youth with autism spectrum disorder. *Autism.* maio de 2019;23(4):1046–50.
- [16] Luçardo J da C, Monk GF, Dias M da S, Martins-Silva T, Fernandes MP, Maia JC, et al. Interest in food and triglyceride concentrations in children and adolescents with autistic spectrum disorder. *J Pediatr Rio J.* fevereiro de 2021;97(1):103–8.
- [17] World Health Organization. The WHO Child Growth Standards [Internet]. [citado 3 de novembro de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/tools/child-growth-standards/standards>
- [18] Viana V, Sinde S. O comportamento alimentar em crianças: Estudo de validação de um questionário numa amostra portuguesa (CEBQ). *Análise Psicológica.* 9 de dezembro de 2012;26(1):111–20.
- [19] Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Nova tabela de Valores de Referência Hematológicos : PNCQ – Programa Nacional de Controle de Qualidade [Internet]. [citado 1º de novembro de 2021]. Disponível em: <https://pncq.org.br/nova-tabela-de-valores-de-referencia-hematologicos/>
- [20] Zaldivar F, McMurray RG, Nemet D, Galasseti P, Mills PJ, Cooper DM. Body fat and circulating leukocytes in children. *Int J Obes.* junho de 2006;30(6):906–11.
- [21] Tenório TR dos S, Farah BQ, Ritti-Dias RM, Botero JP, Brito DC, Moura PMMF de, et al. Relation between leukocyte count, adiposity, and cardiorespiratory fitness in pubertal adolescents. *Einstein Sao Paulo Braz.* dezembro de 2014;12(4):420–4.
- [22] Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology [Internet]. Vol. 6th Edition. Elsevier; 2007. 336 p. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/basic-immunology/abbas/978-0-323-54943-1>
- [23] Brigida A, Schultz S, Cascone M, Antonucci N, Siniscalco D. Endocannabinoid Signal Dysregulation in Autism Spectrum Disorders: A Correlation Link between Inflammatory State and Neuro-Immune Alterations. *Int J Mol Sci.* 3 de julho de 2017;18(7):1425.
- [24] Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* fevereiro de 2011;11(2):85–97.
- [25] López-Cacho JM, Gallardo S, Posada M, Aguerri M, Calzada D, Mayayo T, et al. Caracterização de fenótipos de células imunes em adultos com transtornos do espectro do autismo. 2016;9.
- [26] Ceylan MF, Tural Hesapcioglu S, Yavas CP, Senat A, Erel O. Serum Is-Modified Albumin Levels, Myeloperoxidase Activity and Peripheral Blood Mononuclear Chemia cells in Autism Spectrum Disorder (ASD). *J Autism Dev Disord.* 7 de outubro de 2020;

- [27] Naaijen J, Zwiers MP, Amiri H, Williams SCR, Durston S, Oranje B, et al. Fronto-Striatal Glutamate in Autism Spectrum Disorder and Obsessive Compulsive Disorder. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. novembro de 2017;42(12):2456–65.
- [28] Castro K, Faccioli LS, Baronio D, Gottfried C, Perry IS, Riesgo R. Feeding behavior and dietary intake of male children and adolescents with autism spectrum disorder: A case-control study. *Int J Dev Neurosci*. outubro de 2016;53:68–74.
- [29] Vereecken C, Legtest E, De Bourdeaudhuij I, Maes L. Associations between General Parenting Styles and Specific Food-Related Parenting Practices and Children's Food Consumption. *Am J Health Promot*. março de 2009;23(4):233–40.
- [30] Tahmasebi H, Higgins V, Bohn MK, Hall A, Adeli K. CALIPER Hematology Reference Standards (I). *Am J Clin Pathol*. 5 de agosto de 2020;154(3):330–41.

Tabela 1. Contagem absoluta de monócitos segundo características sociodemográficas, uso de antipsicótico e estado nutricional de crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo. Núcleo de Neurodesenvolvimento, Pelotas, 2018-2020 (n= 68).

Variáveis	N	%	Monócitos (mm ³)		p
			Média	DP ^g	
Escolaridade da mãe^c					
≤ 8 anos	25	38	496	181	0.756 ^a
≥9 anos	40	62	480	217	
Renda familiar					
< 1 salário mínimo	20	29	506	201	0.581 ^a
≥ 1 salário mínimo	48	71	477	196	
Sexo					
Masculino	54	79	491	183	0.649 ^a
Feminino	14	21	464	256	
Idade					
≤ 5 anos	15	22	438	185	0.813 ^b
6 a 10 anos	33	48	500	211	
≥ 11 anos	20	30	497	191	
Cor da pele					
Branca	52	76	493	208	0.596 ^a
Não branca	16	24	462	171	
Sono^d					
≤ 7 horas	10	15	430	171	0.345 ^a
>7 horas	56	85	495	203	
Uso de antipsicótico					
Sim	42	62	511	216	0.183 ^a
Não	26	38	445	162	
Estado nutricional^{e,f}					
Com excesso peso	42	66	522	211	0.013 ^a
Sem excesso peso	22	34	394	142	

^a Valor p refere-se ao teste T; ^bValor p refere-se ao teste ANOVA; ^cVariável com três dados faltantes; ^dVariável com dois dados faltantes; ^eClassificação pelo índice de massa corporal em escore Z (IMC-z) para a idade, sem excesso peso: IMC-z ≤ 1 escore-z, com

excesso peso: IMC-z >+1 escore-z; ^f Variável com quatro dados faltantes; ^gDesvio padrão.

Tabela 2. Contagem absoluta de monócitos segundo a pontuação nos subdomínios da escala CEBQ^a em crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo. Núcleo de Neurodesenvolvimento, Pelotas-RS, 2018-2020 (n= 68).

Subdomínios CEBQ ^a	N	%	Monócitos (/mm ³)		p ^c
			Média	DP ^d	
<u>Domínio 1</u>					
Prazer comer					
Abaixo média (≤ 3.50)	30	44	446	141	0.151
Acima média (≥ 3.51)	38	56	516	231	
Resposta a comida^b					
Abaixo média (≤ 3.07)	35	52	431	149	0.019
Acima média (≥ 3.08)	32	48	544	232	
Desejo de beber					
Abaixo média (≤ 3.07)	35	51	484	172	0.967
Acima média (≥ 3.08)	33	49	486	226	
Sobre ingestão emocional					
Abaixo média (≤ 2.73)	41	52	422	126	0.009
Acima média (≥ 2.74)	27	48	581	247	
<u>Domínio 2</u>					
Sub ingestão emocional					
Abaixo média (≤ 2.57)	35	52	538	218	0.024
Acima média (≥ 2.58)	33	48	430	161	
Resposta à saciedade					
Abaixo média (≤ 2.70)	36	53	502	206	0.479
Acima média (≥ 2.71)	32	47	467	191	
Ingestão Lenta					
Abaixo média (≤ 2.48)	36	53	536	214	0.023
Acima média (≥ 2.49)	32	47	428	165	
Seletividade					
Abaixo média (≤ 2.89)	37	54	459	164	0.245
Acima média (≥ 2.90)	31	46	516	232	

^aCEBQ = *Children's Eating Behaviour Questionnaire*; ^bVariável com um dado faltante

^cValor p refere-se ao teste t de *Student*; ^dDesvio padrão.

Tabela 3. Regressão linear do número de monócitos e o estado nutricional de crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo. Núcleo de Neurodesenvolvimento, Pelotas-RS, 2018-2020 (n= 64).

Estado Nutricional ^a	Monócitos (mm ³)									
	Análise bruta					Análise ajustada ^b				
	B	IC 95%	β	R ²	<i>p</i>	B	IC 95%	β	R ²	<i>p</i>
Sem excesso de peso	Ref.					Ref				
Com excesso de peso	64.0	13.9-114.1	0.30	8	0.01	37.1	17.1-91.3	0.29	14	0.02

^a Variável com quarto dados faltantes;

^b Ajustado para “Sobre ingestão emocional”, CEBQ = *Children’s Eating Behaviour Questionnaire*;

B= Constante de regressão linear;

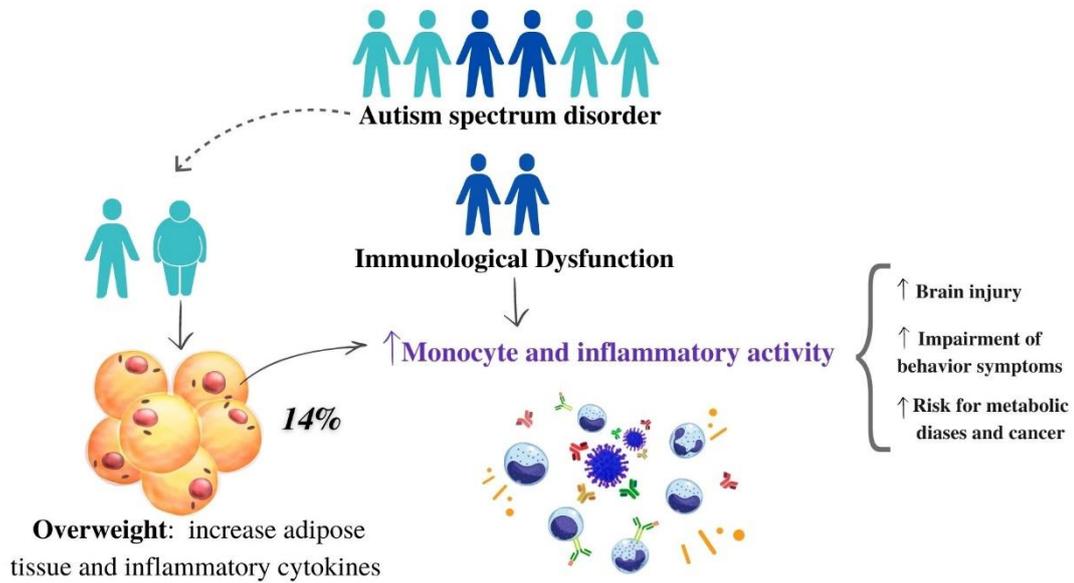
IC= Intervalo de confiança;

β = Coeficiente de regressão linear;

R²= R quadrado ajustado;

p-valor.

Figura 1. Relação entre o excesso de peso em crianças e adolescentes com TEA e a contagem de monócitos. Centro de Neurodesenvolvimento, Pelotas, Brasil (2018-2020).
 Nota: Na amostra de 68 pacientes (3 a 18 anos), a presença de excesso de peso resultou em um aumento de 14% na contagem de monócitos



Material suplementar

Tabela Suplementar 1. Característica do leucograma conforme a categoria de faixa etária, de crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo. Núcleo de Neurodesenvolvimento, Pelotas, 2018-2020 (n= 68).

	Contagem de células (mm ³)				<i>p</i> ^b
	%	Média	Desvio padrão ^a	Valores de referencia	
≤ 5 anos (n=15)					
Leucócitos	100	10.287	3.338	10.000	0.74
Neutrófilos	48	4.907	2.197	4.750	0.78
Monócitos	4	438	185	600	0.00
Linfócitos	42	4.324	1.867	7.500	0.00
Eosinófilos	5	468	574	550	0.00
6 a 10 anos (n=33)					
Leucócitos	100	8.783	2.422	9.000	0.61
Neutrófilos	51	4.442	1.898	5.000	0.10
Monócitos	6	500	211	600	0.01
Linfócitos	38	3.356	992	3.000	0.04
Eosinófilos	5	397	317	550	0.00
≥ 11 anos (n=20)					
Leucócitos	100	7.908	1.733	7.000	0.03
Neutrófilos	54	4.232	1.293	4.500	0.36
Monócitos	6	497	191	600	0.02
Linfócitos	36	2.854	901	2.000	0.00
Eosinófilos	4	277	251	260	0.00

^aDesvio padrão; ^bvalor de *p* refere-se ao teste t de *Student* para uma amostra.