

## PERFIL DO CORTISOL SALIVAR EM MÃES DE CRIANÇAS COM DESENVOLVIMENTO TÍPICO

Leonardo Mendonça Arantes (IC), Decio Brunoni (orientador)

**Apoio:** PIBIC Mackenzie

### RESUMO

**Introdução:** O cortisol é essencial à vida e a secreção está influenciada por diversos fatores, entre os quais, as situações de estresse. Estas, durante a gestação, podem gerar aumento da produção de cortisol. Diversas evidências mostram que este fato pode interferir no desenvolvimento futuro das crianças expostas intra-utero. Uma linha de investigação do nosso grupo relaciona-se ao nível de estresse na gestação e risco para Autismo. A pergunta central é: mães de crianças autistas apresentam um perfil particular de resposta ao estresse? Para testar esta hipótese em mães de autistas desenvolvemos este projeto piloto em mães de crianças não autistas, que seriam grupo controle. **Objetivo:** correlacionar o perfil e os níveis de cortisol materno a indicadores de estresse; testar a metodologia de dosagem do cortisol salivar. **Método:** coleta de saliva para a dosagem basal do hormônio cortisol de 7 mães voluntárias de uma escola pública de ensino fundamental e médio e aplicação de questionários indicativos de ansiedade e estresse. As amostras foram coletadas e armazenadas segundo protocolo clássico. As dosagens foram feitas em duplicatas com o kit Salimetrics® Cortisol. A análise do cortisol salivar foi realizada no LAC Laboratório de Análises Clínicas – CCBS da Universidade Presbiteriana Mackenzie. **Resultados e Discussão:** A metodologia aplicada para a dosagem do cortisol foi adequada com resultados em todas as dosagens. Os valores encontrados estão de acordo com os valores esperados para a população de referência. As tarefas de estresse não conseguiram induzir aumento do cortisol não alcançou os níveis de cortisol desejado, o que indica que a atividade submetida as mães não causaram o estresse pretendido. Os resultados redirecionaram o protocolo das tarefas de indução de estresse para a população de mães de autistas.

**Palavras-chave:** cortisol salivar, tarefas de estresse, teste de protocolo

## ABSTRACT

**Introduction:** Cortisol is essential to life and secretion is influenced by several factors, including stress situations. During pregnancy, stress situations can lead to increased cortisol production. Several evidences show that this fact may interfere in the future development of the children exposed intra-utero. One line of research from our group relates to the level of stress in gestation and risk for Autism. The central question is: do mothers of autistic children have a particular profile of stress response? To test this hypothesis in autistic mothers we developed this pilot project in mothers of non-autistic children. **Objective:** to correlate the profile and levels of maternal cortisol to stress indicators; to test salivary cortisol dosing methodology. **Method:** saliva collection for the baseline dosage of the hormone cortisol of 7 volunteer mothers of a public primary and secondary school and the application of questionnaires indicative of anxiety and stress. The samples were collected and stored according to classic protocol. Dosages were made in duplicates with the Salimetrics®

Cortisol kit. The experiments were carried out at the LAC - Clinical Analysis Laboratory - CCBS da Universidade Presbiteriana Mackenzie. **Results and discussion:** The methodology applied for the dosage of cortisol was successful, since the values found were in agreement with the values within their due proportions, however the method of stress activity submitted to the mothers did not reach the desired cortisol levels, indicating that the activity submitted to the mothers did not cause the desired stress. The results redirected the protocol of the tasks of stress induction for the population of mothers of autistics.

**Keywords:** cortisol dosage; epigenetics; cortisol profile on mothers.

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1938, Leo Kanner descreveu, pela primeira vez, uma série de sintomas em crianças, que ele identificou como distúrbios autísticos do contato afetivo (KANNER, 1943). Anos de estudos se passaram, novos conhecimentos foram produzidos e outros refutados em relação à etiologia desses distúrbios que, mais tarde, foram denominados de Transtornos Globais do Desenvolvimento -TGD.

Hoje o TGD é denominado de Transtorno do Espectro Autista (TEA), sendo um transtorno do desenvolvimento para o qual os fatores causais podem ser múltiplos. Aqueles que caem no espectro devem exibir uma combinação de sintomas que estão delineados pela última edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais –DSM-5. Nele o TEA é considerado um único transtorno, tendo como característica diagnóstica as deficiências sociais e de comunicação e os interesses restritos associados aos comportamentos repetitivos (DSM-5, 2014).

Muitas pesquisas envolvendo fatores genético tem sido realizadas nas últimas décadas. Mutações gênicas e cromossômicas estão implicados no autismo, representando coletivamente cerca de 15% dos casos. Desta forma o TEA pode ser atribuído a alterações genéticas individuais em número restrito de casos. Além das causas genéticas, fatores epigenéticos e ambientais tem sido associados ao TEA. Esta categoria contribui com cerca de 5% dos casos. Na maioria dos indivíduos com TEA – 80% dos casos, uma causa específica não é encontrada. Neles o modelo etiológico mais aceito é o da herança multifatorial, combinação de uma arquitetura genética de vulnerabilidade com causas ambientais perinatais (ABRAHAMS; GESCHWIND, 2010; KAHN, 2011).

Diversos estudos têm encontrado uma associação entre o TEA e fatores ambientais perinatais. Em todos há uma concordância de que o estresse é um fator ligado ao autismo. Esse foco no estresse se torna importante porque ele pode ser um fator de risco com contribuição para o desenvolvimento de TEA, principalmente em indivíduos geneticamente susceptíveis (HEBERT, 2010; PERRONE-MCGOVERN; SIMON-DACK; NICCOLAI, 2015). O estresse tem efeitos significativos sobre o eixo Hipófise-Hipotálamo-Adrenal (HHA) e a síntese de cortisol. Este mecanismo mediará às alterações cerebrais possivelmente implicadas na patogênese do TEA, segundo evidências em humanos e animais (GRABRUCKER, 2013). Portanto, o estresse pré-natal é considerado como fator de risco gestacional no diagnóstico futuro do TEA. O objetivo principal desse projeto é correlacionar o perfil e os níveis de cortisol materno a indicadores de estresse e testar a metodologia de dosagem do cortisol salivar.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### Genética, Epigenética e o Modelo Multifatorial

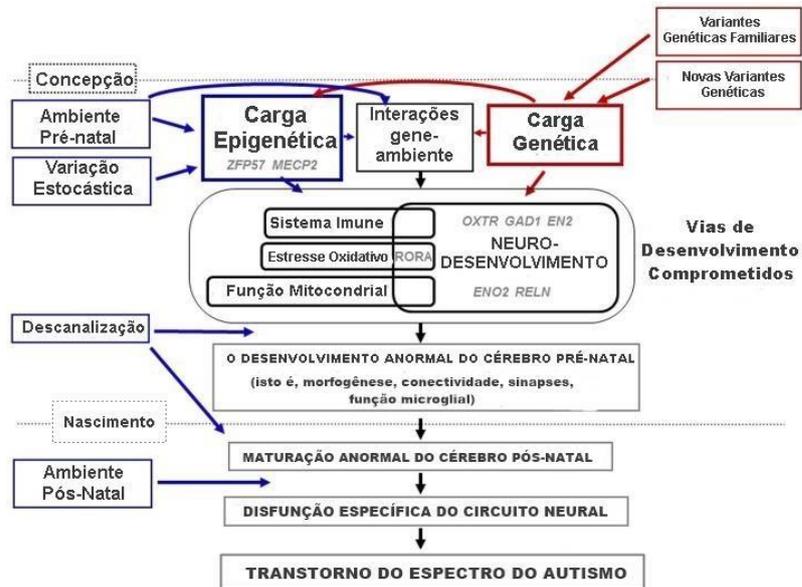
Doenças multifatoriais são causadas por múltiplos fatores genéticos, com prováveis contribuições e interações envolvendo fatores ambientais. Essas doenças, apesar de se agruparem em famílias, não possuem um padrão de herança claro, sendo difíceis de estudar porque os fatores que causam esses distúrbios ainda não estão claros (USTAD et al, 2013; HINDORFF, 2013). São diversos os exemplos de doenças com herança multifatorial: câncer, autismo, diabetes, obesidade, doença coronarianas, entre outras. Nelas, as alterações genéticas podem ser causadas por um efeito combinatório de muitas mutações em diferentes genes, com efeitos individuais, sendo algumas raras e de efeito heterogêneo, com um fenótipo que pode variar significativamente em cada caso (CHO; KIM; PRZYTYCKA, 2012).

A epigenética refere-se a mudanças na expressão gênica sem alterações na sequência de DNA. Essas mudanças, apesar de herdáveis podem ser reversíveis alterando o estado de metilação do DNA e/ou a estrutura da cromatina (HENIKOFF; MATZKE, 1997). Os chamados mecanismos epigenéticos não alteram a sequência do gene, mas modulam a sua expressão, sendo alguns desses mecanismos: o processo de metilação do DNA, a modificação de histonas, a remodelação da cromatina e a retroalimentação transcricional (MA et al, 2010). Eles são responsáveis por regular a transcrição dos genes e a compactação do DNA na célula (PROVENÇAL; BINDER, 2015).

Estudos em animais e também em humanos têm demonstrado que, os fatores ambientais pré e neonatais alteram os padrões de metilação do DNA e essas alterações podem durar a vida toda (WEAVER et al, 2004; SZYF, 2011; KUBOTA; MIYAKE; HIRASAWA, 2012).

Sendo assim, a ação de fatores epigenéticos, genéticos e ambientais interagem e podem comprometer o desenvolvimento neurológico, levando a defeitos da função sináptica, de conectividade e morfogênese, ocasionando a maturação anormal do cérebro em TEA, como mostra a Figura 1.

**Figura 1-** Interação entre fatores Genéticos, epigenéticos e ambientais no desenvolvimento neural no TEA.



(LOKE; HANNAN; CRAIG, 2015; Tradução de: GARCIA, A H C.)

Diversos fatores ambientais podem intervir e afetar os mecanismos epigenéticos com modificação na expressão gênica tanto nos indivíduos como intergerações. O estresse materno com aumento na produção do cortisol parece ser um desses fatores e influenciar cada um dos mecanismos epigenéticos, pois as células, em resposta ao estresse, possuem vários mecanismos de regulação da expressão gênica (Figura 3), sem alterar a sequência de seu DNA (BOHACEK; MANSU, 2013; GRIFFITHS; HUNTER, 2014.)

### Estresse materno e o eixo Hipófise Hipotálamo Adrenal (HHA)

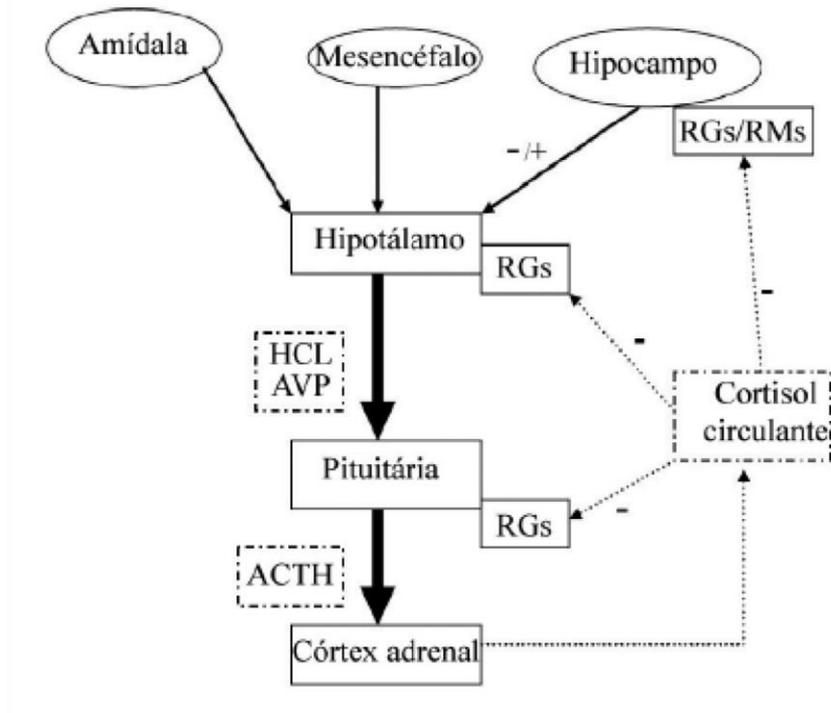
Há um consenso, que fatores que geram estresse durante a gravidez podem afetar o feto. Pesquisas indicam que o estresse materno pré-natal em roedores e primatas não-humanos tem influência negativa, em longo prazo, no processo de aprendizagem, no desenvolvimento motor e no comportamento em sua prole. (DIPIETRO, 2004). Em consonância a isso, o TEA tem sido descrito como um distúrbio acompanhado pelo aumento da excitação, do estresse, e da sensibilidade sensorial. O eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) já foi demonstrado por refletir o aumento dos níveis de excitação e estresse. Assim, o eixo HHA tem sido estudado em TEA (CORBETT et al, 2006; CORBETT et al, 2008; CORBETT et al, 2009).

## **O eixo HHA**

Para entender a importância desse eixo e a sua relação com o autismo, torna-se necessário conhecer seu principal hormônio – o cortisol. O cortisol é um hormônio corticosteróide da família dos esteróides que possui sua produção controlada pelo eixo HHA (SCHREIER et al, 2015), tem características hidrofóbicas e lipofílicas, o que permite sua fácil entrada nas células ou interação com os receptores celulares, sendo que seu transporte na corrente sanguínea ocorrerá ligado a proteína transcortina (CBG), ou ainda que em menor grau, a albumina (GANONG, 1991). Apenas 5 a 10% do cortisol circulante é livre e biologicamente ativo. Essa fração livre do cortisol difunde-se para a saliva (GRANGER et al, 2009; NELSON, 2000). O cortisol é produzido no córtex da glândula suprarrenal (adrenal), porção fasciculada ou média que é estimulada pelo lóbulo anterior da hipófise através do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cuja produção é controlada pelo hipotálamo, através da secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Sua forma sintética é a hidrocortisona. Seu controle é por feedback negativo, isto é, o produto final liberado na corrente sanguínea inibe a atividade adrenocortical subsequente, conforme esquematiza a figura 4 (LEVI, 2004; GRANGER et al, 2009.).

A concentrações circulantes de cortisol, após um estímulo externo ou interno, aumentam após poucos minutos da ativação do eixo HHA, e sua meia vida varia entre 60 a 90 minutos.

(GRANGER et al, 2009).

**Figura 2-** Diagrama Esquemático do Eixo HHA descrevendo a sua regulação e o feedback negativo

HCL- hormônio liberador da corticotropina

AVP - vasopressina

RM - receptores de mineralocorticóides

ACTH - adrenocorticotrópico

RG- glicocorticóides

(JURUENA et al, 2004)

O Cortisol é essencial à vida, pois o ser humano não sobrevive por muito tempo após a retirada de ambas as adrenais, mesmo com a reposição dos glicocorticóides (LEVI, 2004). É um hormônio que obedece a um ritmo circadiano, com elevadas concentrações na parte da manhã e um decréscimo ao longo do dia, com os níveis mais baixos à noite. Esse padrão diurno já está bem estabelecido desde o terceiro mês de vida (CHAMBERLAIN; HERMAN, 1990; CORBETT, 2009). O cortisol modula diversas funções orgânicas, como as ações metabólicas, estimulando a quebra de gorduras e proteínas e a metabolização da glicose no fígado, estando diretamente envolvido na resposta ao estresse, pois ativa respostas do corpo diante de situações estressantes como, por exemplo, de medo e perigo propiciando uma resposta física, ao aumentar a pressão arterial e o açúcar no sangue, produzindo maior energia muscular, para a luta ou fuga. Se o estresse for passageiro, superada a questão, os níveis hormonais e o processo fisiológico voltam à normalidade, mas quando este se prolonga, os níveis de cortisol no organismo permanecem aumentados (LEVY, 2004). A experiência de estresse se dá pela percepção da mudança ambiental ou física, seja essa negativa ou positiva, para defender a homeostase. Contudo, o controle inadequado de respostas ao

estresse representa uma grave ameaça para a saúde e o bemestar do corpo (LEVI, 2004; WALKER; TERRY; LIGHTMAN, 2010).

A resposta ao estresse pelo eixo HHA ocorre através de interações entre os circuitos do cérebro que são sensíveis ao estresse e os neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. Há respostas imediatas a estressores sistêmicos, onde o tronco encefálico catecolaminérgico parece estar envolvido. Existe também, uma resposta a estressores que exigem uma interpretação pelas estruturas cerebrais superiores, através do córtex da região límbica que se liga aos neurônios contendo GABA do PVN no hipotálamo. Assim, a elaboração final de respostas ao estresse é susceptível de envolver a modulação por esses neurônios do PVN. Após estimulação pelo estresse, estes neurônios secretam o hormônio liberador da corticotropina (CRH) que estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise. Os aumentos subsequentes do ACTH conduzem a síntese e a secreção de glicocorticóides (CORT) pelo córtex adrenal.

### **O estresse, eixo HHA e o Neurodesenvolvimento**

O estresse pré-natal está associado ao aumento do risco de doença psiquiátrica na prole, dentre elas o TEA além de padrões atípicos de emoções e comportamento (MARKHAM; KOENIG, 2011).

Vários estudos prospectivos com perspectivas independentes, revisados por Talge; Neal & Glover (2007), mostraram que o estresse na gravidez pode estar ligado ao fato de gerar filhos mais propensos a problemas emocionais ou cognitivos, incluindo um aumento do risco de déficit de atenção e hiperatividade, ansiedade e alterações da linguagem. Os estudos mostraram uma forte correlação entre os níveis de cortisol materno e fetal, mas não explicaram alguns problemas envolvidos nesta interação, como o declínio na resposta ao cortisol no curso da gestação. Os autores propõem que uma hiper resposta ao cortisol pode ser a causa do problema (TALGE; NEAL; GLOVER, 2007). Outros autores apontam que estresse materno pode alterar o desenvolvimento neurológico do feto em humanos

(O'DONNELL; O'CONNOR; GLOVER, 2009).

A avaliação de 125 crianças de 3, 6 e 12 meses e suas mães, mostrou que tanto o estresse endocrinológico como o psicossocial tiveram uma importante influência sobre o desenvolvimento infantil no primeiro ano de vida, sendo que os seus efeitos foram dependentes do período e do tempo de exposição aos mesmos (DAVIS; SANDMAN, 2010). A exposição pré-natal à glicocorticóides tem profundas influências sobre a função do eixo HHA, tanto em animais como em seres humanos. Baixo nível de cortisol é visto em condições de estresse crônico e em situações sociais caracterizadas por relações sociais instáveis. Os

resultados de vários laboratórios, que investigaram tanto as crianças com TEA quanto seus pais, apoiam ainda mais o conhecimento de que as mães podem compartilhar algumas características metabólicas com seus filhos com TEA e que há necessidade de intervenção em ambos (STRUNECKA, 2011).

O estresse pré-natal foi ainda associado ao TEA no trabalho que encontrou um aumento significativo nos eventos estressores nas gestações de 21 a 32 semanas, (BEVERSDORF et al, 2005). Já o estresse pré-natal por luto da mãe e o TEA não tiveram uma correlação positiva (LI et al, 2009).

Quase todos os estudos encontraram correlação entre os níveis de cortisol e hormônio adrenocorticotrófico em TEA, sugerindo que o aumento dos níveis séricos basais de hormônio adrenocorticotrófico acompanhado pelo aumento do hormônio cortisol podem ser marcadores biológicos úteis para o mesmo (IWATA et al, 2011). Um deles propôs que a superexposição fetal aos glicocorticóides, exógenos ou endógenos, pode ser a base, pelo menos em parte, da ligação entre o ambiente pré-natal e estresse materno com os distúrbios comportamentais, dentre eles o TEA (WELBERG; SECKL, 2001).

Assim um modelo bioquímico proposto para o TEA pode resultar de uma disfunção da hipófise no eixo HHA em um subconjunto de indivíduos com o transtorno (CHAMBERLAIN; HERMAN, 1990; CORBETT et al, 2009), ou em suas mães uma vez que os glicocorticóides têm uma poderosa influência sobre o crescimento, maturação e remodelação do tecido durante o desenvolvimento fetal. A sua utilização, na gravidez humana em risco de parto prematuro, reduz a mortalidade e morbidade neonatal. Estes efeitos benéficos de curto prazo, dos glicocorticóides no período pré-natal, no entanto, aumentam os riscos, em longo prazo, de desregulação das funções endócrinas e metabólicas, incluindo a resposta ao estresse, crescimento e reprodução, conforme figura 6.

(MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI; NESTOROVIC; MILOŠEVIĆ, 2012).

Do exposto, se conclui que estresse materno, pode ser então considerado um candidato ambiental com probabilidades de possuir efeitos epigenéticos, em indivíduos geneticamente vulneráveis. (DETH et al., 2008; GRABRUCKER, 2013). Este efeito deve ser investigado como uma das possíveis causas envolvidas no TEA (KINNEY et al, 2008).

### **3. MÉTODO**

#### **Seleção da Amostra**

A pesquisa foi composta por 7 mães de filhos com diagnóstico de TEA excluído, com idades entre 25 a 48 anos e idade média de 35,14 anos, todas as participantes do projeto tinham filhos matriculados na escola Estadual Laura Lopes, de São Caetano do sul, onde

ocorreu a coleta de dados dos questionários e a coleta da saliva para a dosagem do cortisol basal. Todas as mães foram convidadas a participar do projeto e a comparecer no local e permanecer de 2 a 3 horas. Foram excluídas da pesquisa todas as mães com diagnóstico de doenças psiquiátricas, epilepsia, uso de corticosteroides, com uso de antidepressivos e ansiolíticos e aquelas com obesidade mórbida. Os valores expressos na tabela 1 por idade e período (manhã ou tarde) da coleta são os valores esperados para população geral.

**Tabela 1.** Valores de referência dos níveis de cortisol presentes na instrução do kit Salivette® Cortisol.

Grupo	manhã	Tarde
mulher adulta, idade 21-30	0,272-1,348	ND-0,359
mulher adulta, idade 31-50	0,094-1,551	ND-0,181

## Instrumentos

### a) Inventário de Ansiedade de Beck (Beck Anxiety Inventory) - BAI

O inventário de ansiedade de Beck (BAI) foi desenvolvido para avaliar o rigor dos sintomas de ansiedade em pacientes deprimidos (BECK et al., 1988). Sua utilidade principal é para auxiliar na diferenciação entre ansiedade e depressão.

A versão em português é de responsabilidade da Casa do Psicólogo Editora (CUNHA, 2001). O instrumento é autoaplicado e composto por 21 sintomas de ansiedade. A pessoa responde levando em consideração a última semana, incluindo o dia da resposta. Os sintomas são qualificados pela intensidade: de absolutamente não, levemente, moderadamente até gravemente (CUNHA, 2001)

### b) Inventário de Sintomas de Stress para Adultos de Lipp – ISSL

O inventário de sintomas de stress de Lipp (ISSL) é uma escala formada por três quadros diferentes, sendo que o primeiro quadro contém 15 itens referentes a sintomas físicos ou psicológicos que a pessoa passou pelas últimas 24 horas, o segundo é composto por 15 itens, sendo 10 deles relacionados a sintomas físicos e 5 deles a sintomas psicológicos experimentados nas últimas semanas e o terceiro quadro possui 12 itens relacionados a sintomas físicos e 11 psicológicos experimentados no último mês (LIPP, 2000). O ISSL (LIPP, 2005) pode ser autoaplicado e visa identificar de modo objetivo a sintomatologia de stress, se somático ou psicológico e a fase em que se encontra. É normatizado para a população brasileira e tem sido amplamente empregado em pesquisas nacionais. A aplicação leva em torno de dez minutos e a interpretação dos escores permite categorizar os indivíduos como

tendo ou não stress e em que fase se encontram (alerta, resistência, quase-exaustão e exaustão).

c) Escala de Afetos Positivos e Negativos - PANAS

PANAS é uma escala criada por Watson; Clark; Tellegen (1988), que possui sua versão em português desenvolvida por Hutz e Giacomoni (1997) e determina os afetos positivos e negativos, em uma escala Likert de 5 pontos, onde cada palavra representa emoções, e cada emoção é representada de 1 a 5 pontos, sendo 1 significando “Não me representa em nada”; 2 “Me representa um pouco”; 3 “Me representa moderadamente”; 4 “Me representa bastante”; 5 “Me representa perfeitamente”. Essa escala pode ser utilizada para avaliar os sentimentos dos participantes, no momento presente (GALINHA; PEREIRA; ESTEVES, 2014). e assim avaliar se ocorreu alteração nos afetos positivos e negativos dos participantes, no momento em questão.

## TAREFAS DE ESTRESSE

A tarefa de estresse descrita foi um estudo piloto, realizado para testar uma nova metodologia, sendo realizada com um grupo menor de participantes. Ela permitiu a alteração e o aperfeiçoamento dos métodos (BAILER; TOMITCH; D'ELY, 2011) da pesquisa a qual foi realizada posteriormente. O piloto foi executado na escola Estadual Laura Lopes, de São Caetano do Sul. Algumas mães de crianças dessa escola foram selecionadas, conforme a faixa etária dos filhos, para a coleta de dados. Elas foram convidadas por telefone para participarem da pesquisa e informadas de que teriam que permanecer cerca de 2 a 3 horas na escola, em dia e horário previamente agendados.

A coleta de dados do piloto foi processada da seguinte maneira: As mães que foram convidadas e compareceram no local, chegaram para a coleta de dados, descansaram por cerca de 15 minutos, e então foi coletada a saliva de todas as mães para análise do Cortisol 1 e logo depois, passaram a responder os instrumentos PANAS, IDATE, BAI, ISSL, um questionário sócio econômico. Foi lido e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

As mães, de forma individual, foram então encaminhadas para sala da tarefa de estresse. Nessa tarefa foi dito a cada mãe que elas seriam filmadas, e esse vídeo seria posteriormente analisado por uma equipe de profissionais, e nele elas teriam que responder sobre a pergunta: “Fale como é morar na sua cidade. Como você se sente em relação a saúde transporte e segurança? “. As mães tiveram que falar sobre o tema voltadas para câmera que as gravava.

Após o vídeo, as mães passaram a uma tarefa cognitiva no computador chamada de **N-back**. O processo do N-back foi explicado e as mães executaram o mesmo. Nova amostra de saliva foi coletada (cortisol 2), e as mães responderam novamente os instrumentos BAI e PANAS. A mãe que realizou a tarefa retornou a sala anterior, descansou por cerca de 15 minutos e então foi coletada a amostra de saliva para o cortisol 3, e assim sucessivamente com cada mãe. Depois da coleta do cortisol 3, responderam novamente o BAI e o PANAS e foram dispensadas. As salivas coletadas seguiram para análise no **LAC - Laboratório de Análises Clínicas – CCBS da Universidade Presbiteriana Mackenzie**.

### **Dosagem do cortisol – Anexo A**

A medição do cortisol salivar fornece uma medida simples, rápida, não invasiva, e livre de estresse e ela avalia a fração livre do hormônio sendo útil para o estudo do ritmo circadiano do cortisol, para avaliar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), bem como condições de estresse, ansiedade, depressão, síndrome do pânico e no diagnóstico da síndrome de Cushing, dentre outros. (KIRSCHBAUM; HELLHAMMER,2000; GARDE; HANSEN, 2005).

Na análise dos níveis de cortisol salivar, a coleta e o armazenamento da amostra são fatores importantes para a confiabilidade dos resultados. Por conseguinte, houve a padronização da coleta e do armazenamento da amostra bem como a verificação dos dados gerais dos participantes como, a qualidade do sono, sua alimentação, jejum, estresse, e ansiedade e as medicações utilizadas. (KIRSCHBAUM; HELLHAMMER,2000; CASTRO; MOREIRA, 2003).

A dosagem do cortisol salivar foi realizada usando o Kit de imunossensaio da Salimetrics® Cortisol. O cortisol salivar foi coletado usando kit Salivette® Cortisol.

As coletas de saliva foram realizadas em uma sala tranquila, e a cada participante presente foi dado uma capsula, onde ficaria a saliva e essa capsula seria armazenada em um local frio para preservar a coleta, foram realizadas 3 coletas em diferentes tempos como explicado anteriormente, a primeira coleta foi após alguns minutos depois da chegada da participante, a segunda coleta foi feita logo após a atividade de estresse e a terceira coleta após meia hora depois da atividade de estresse.

Conforme preconizado na bula do kit Salimetrics® Cortisol, todas as participantes foram orientadas a ficar sem ingerir grandes refeições, alimentos ácidos e ricos em açúcar uma hora antes do teste e sem ingerir álcool 12 horas antes da primeira coleta pois poderia afetar o desempenho do ensaio através da redução do pH da amostra e influenciando o crescimento bacteriano. Esses fatores poderiam ser minimizados lavando a boca 10 minutos antes da coleta.

As amostras foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas do Curso de Farmácia da UPM com a supervisão do Prof. Éder de Carvalho Pincinato com protocolo padrão fornecido pelo kit do fornecedor.

#### 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

O grupo da pesquisa foi constituído de 7 mães, sendo todas as mães com filhos que tiveram o diagnóstico de TEA excluído. As coletas foram feitas em diferentes períodos do dia, sendo 3 amostras de saliva coletada no período da manhã entre 9h e 11h e as outras 4 amostras coletadas no período da tarde, a partir da 13h. Todas as leituras das amostras foram feitas em duplicatas para garantir a precisão da leitura em um único equipamento.

**Tabela 2.** Média de absorção do cortisol conjugado, da quantidade diluída de cada amostra e a relação entre a amostra e o Zero.

Poço	Padrão	Média Abs	B/Bo	Cortisol (ug/dL)
A1B1	P1	0,2235	0,097876	3,000
C1D1	P2	0,509	0,222903	1,000
E1F1	P3	1,0555	0,462229	0,333
G1H1	P4	1,6885	0,739435	0,111
A2B2	P5	1,953	0,855266	0,037
C2D2	P6	2,052	0,898621	0,012
E2F2	ZERO	2,2835	na	na
G2H2	NSB	na	na	na

Todos os valores de absorção dentro do esperado.

A tabela 2 mostra a média de absorção, a quantidade diluída de cada amostra e a relação entre a amostra e o Zero, sendo todos os valores de absorção dentro do esperado.

Os instrumentos aplicados tiveram os resultados obtidos na tabela (3). O PANAS foi aplicado 3 vezes, para avaliar se esta tarefa de estresse estava sendo efetiva na sua promoção, sendo que, para isso deveria haver um aumento dos sentimentos negativos e a diminuição dos sentimentos positivos após a tarefa de estresse (VAN DENBERG; CUSTERS, 2011). A análise do PANAS permitiu avaliar que o PANAS 1 (antes da tarefa de estresse) quando comparado com o PANAS 2 (logo depois da tarefa de estresse) obteve uma queda no afeto

negativo, na maioria das mães, sem diferenças estatísticas ( $p = 0,35$ ), contudo os resultados parecem demonstrar que elas se sentiram mais desconfortáveis ao chegar no local da pesquisa que após a atividade de estresse, sinalizando que a atividade de estresse realizada não alcançou o efeito desejado. Enquanto a comparação do PANAS 2 com o 3 também houve uma queda no afeto negativo, indicando que no final as participantes da pesquisa estavam cada vez mais confortáveis, onde o afeto positivo teve variações elevadas do PANAS 1 para o PANAS 2 nas mães 10, 15 e 16 e houve uma queda deste nas mães 13 e 14, já nas mães 11 e 12 o valor se manteve. Em relação ao PANAS 3 as participantes 10,11 e 13 elevaram o valor do afeto positivo e nas participantes 12,14, 15 e 16 houve uma queda do afeto positivo.

O questionário BAI, relacionado ao inventário de ansiedade foi aplicado no começo da pesquisa e no final da atividade de estresse. Apenas duas participantes possuíam nível leve de ansiedade no começo, mas após a atividade de estresse elas chegaram ao nível mínimo, e todas as outras participantes mantiveram o nível mínimo.

O ISSL indicou se havia a existência de sintomas de estresse e o nível em que se ele se encontrava. Os resultados obtidos com esse instrumento demonstraram que as mães 10,15 e 16 obtiveram as fases de estresse em resistência o que indica que o organismo tenta se manter em homeostase interna (Lipp, 2000), enquanto a mãe 13 apresentou a fase de alerta, que por sua vez demonstra uma fase positiva ao estresse onde o corpo produz adrenalina, preservando o organismo (Lipp, 2000), as outras participantes da pesquisa 11,12 e 14 não apresentaram níveis de estresse.

**Tabela 3.** Resultados obtidos dos instrumentos aplicados ISSL, BAI 1 e 2, PANAS 1, 2 e 3

IDT	PANAS1		BAI 1	ISSL	PANAS2		BAI 2	PANAS3	
	NEG	POS			NEG	POS		NEG	POS
10	18	21	MIN	17% RES	15	25	MIN	10	33
11	10	35	MIN	NEG	11	35	MIN	10	36
12	12	24	MIN	NEG	12	24	MIN	11	18
				22% Alerta					
13	11	41	MIN	(agr)	10	30	MIN	10	33
14	12	42	MIN	NEG	21	23	MIN	14	21
15	25	28	LEVE	33% RES (agr)	12	36	MIN	12	28
16	10	21	LEVE	17% RES	10	24	MIN	10	19

ANSIEDADE Mínima (MIN) RESISTÊNCIA (RES) SEM ESTRESSE (NEG) EM AGRAVAMENTO (agr).

Foram realizadas 3 dosagens de cortisol, a primeira coleta quando as mães participantes chegaram ao local (após descanso), a segunda coleta após a tarefa de estresse e a terceira

30 minutos após a tarefa de estresse. Os resultados obtidos na tabela 4 indicam que a maioria das mães da pesquisa apresentaram uma queda na segunda dosagem de cortisol, quando submetidas a atividade de estresse, o contrário do esperado.

Houve queda dos níveis de cortisol no tempo 3.

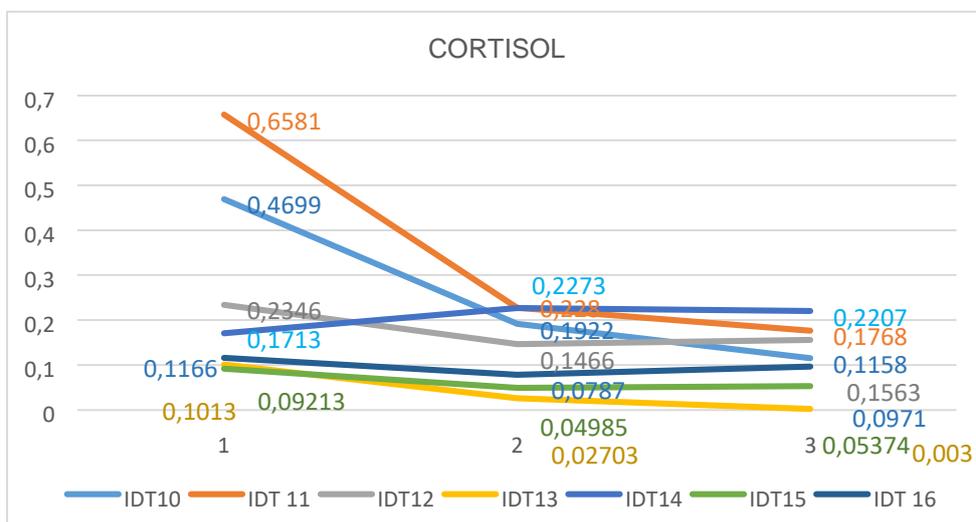
**Tabela 4.** Resultados do cortisol antes, durante e depois da tarefa de estresse.

Controle	tempo 1	tempo 2	tempo 3
10	0,470	0,192	0,116
11	0,658	0,228	0,177
12	0,235	0,147	0,156
13	0,101	0,027	0,003
14	0,171	0,227	0,221
15	0,092	0,050	0,054
16	0,117	0,079	0,097

Tempo 1 – antes da tarefa de estresse; tempo 2 – após a tarefa de estresse e Tempo 3- após 30 minutos de descanso.

Com esses dados da dosagem do cortisol em tempos diferentes foi possível obter um gráfico que demonstrou a variação do cortisol em cada participante e observar o quanto a tarefa realizada pelas mães interferiu na dosagem do cortisol.

**Gráfico 1.** Gráfico das dosagens do cortisol por mãe, nas 3 coletas da pesquisa: antes, durante e depois da tarefa de estresse



#### IDENTIFICAÇÃO - IDT

Nesse gráfico é possível observar as dosagens do cortisol nas 3 dosagens realizadas, uma no primeiro momento após a chegada das mães ao local, a segunda logo após a atividade de estresse e a terceira coleta depois de 30 minutos após a atividade de estresse, no mesmo é possível identificar a variação da quantidade de cortisol de cada participante, sendo indicado por IDT, na IDT 10 é possível ver que o cortisol na primeira coleta está elevado, isso pode ter ocorrido devido a coleta ter sido realizada no período da manhã, e a segunda, trouxe o valor dentro dos parâmetros porém sem o aumento de cortisol depois da atividade de estresse realizada e a terceira coleta diminuiu ainda mais o cortisol, mostrando que após um tempo da atividade de estresse o cortisol abaixou. Na IDT 11 o mesmo pode ser observado em relação a IDT 10, as curvas apresentam o mesmo padrão de queda do cortisol em cada coleta, sendo a IDT 11 outra coleta realizada no período da manhã. Na IDT 12 a dosagem do cortisol na primeira coleta não apresentou valores elevados, a dosagem estava dentro dos padrões, e na segunda dosagem houve uma queda do cortisol, e na terceira coleta foi possível observar uma elevação do cortisol. Na IDT 13 se observa duas quedas do cortisol, sendo elas da primeira para segunda coleta e da segunda para terceira. Na IDT 14 o valor do cortisol no primeiro momento para o segundo, sofre uma elevação e da segunda para terceira coleta há uma leve queda do cortisol, enquanto na IDT 15 há uma queda entre a primeira coleta e a segunda e uma leve elevação da segunda para a terceira coleta, na IDT 16 há queda da primeira coleta para a segunda e uma elevação da segunda para a terceira. Com isso pode se concluir que 6 participantes de 7 obtiveram uma queda no cortisol, comprovando que a atividade de estresse não foi eficiente para a elevação do cortisol, enquanto alguns participantes em relação a segunda coleta e a terceira obtiveram valores mais elevados como as mães das IDT 12,15 e 16, as outras mães obtiveram quedas em relação a segunda coleta para a terceira.

Os agentes estressores podem ter diferentes origens e podem ter influência no organismo, qualquer estímulo externo pode gerar uma resposta do organismo, como em uma situação de estresse os níveis plasmáticos de cortisol podem aumentar drasticamente (ROSA, 2018). Os dados obtidos nos questionários, ao comparar os resultados do cortisol, com o PANAS, foram concordantes e condizentes com cada participante da pesquisa, As participantes 10,11,12,13,15 e 16 alcançaram valores de cortisol menores na segunda coleta em relação a primeira e no PANAS houve a diminuição dos sentimentos negativos (o 11 manteve os mesmos resultados). Esses resultados são o oposto do esperado, pois após a tarefa de estresse era esperado o aumento dos sentimentos negativos e a diminuição dos sentimentos positivos, bem como o aumento dos níveis de cortisol salivar, indicando falha na Tarefa de estresse.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao método de dosagem do cortisol, todos os resultados obtidos estão dentro dos possíveis padrões que podem se encontrar e que foram estabelecidos pelas instruções do kit Salivette® Cortisol, conferindo uma confiabilidade ao método de dosagem e garantindo uma precisão segura. Além disso os resultados obtidos, permitiram a reformulação da tarefa de estresse a ser aplicada, nas mães de crianças com TEA, possibilitando comparar se a reação dessas frente a situações estressantes, difere das mães de crianças com TEA descartado.

O método de avaliação diagnóstica dos alunos do ensino fundamental da rede pública do Município de Barueri, São Paulo tem aprovação dos pareceres CEP-UPM 910/03/06; 1219/04/2010 e 1425/03/2012. O método para dosagem do cortisol foi submetido à Plataforma Brasil.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABRAHAMS, Brett S.; GESCHWIND, Daniel H. Connecting genes to brain in the autism spectrum disorders. **Archives of neurology**, v. 67, n. 4, p. 395-399, 2010.
- ALMEIDA, Claudyane de et al. Saliva cortisol levels and depression in individuals with temporomandibular disorder: preliminary study. **Revista Dor**, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2014.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition: DSM-5. **American Psychiatric Publishing**, 2013. 991p.
- BECK, Aaron T.; STEER, R. A. Beck anxiety inventory (BAI). **BiB** 2010, v. 54, 1988.
- BEVERSDORF, David Q. et al. Timing of prenatal stressors and autism. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 35, n. 4, p. 471-478, 2005.
- BOHACEK, Johannes; MANSUY, Isabelle M. Epigenetic Inheritance of Disease and Disease Risk. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 220, 2013.
- BRUNONI D; BAPTISTA P; OLIVEIRA J. et al. Avaliação diagnóstica de escolares com Transtornos do Espectro do Autismo na rede municipal de ensino de Barueri, SP. Contribuições para a inclusão escolar de alunos com necessidades especiais [livro eletrônico]: **estudos interdisciplinares em educação e saúde em alunos com Transtornos do Espectro do Autismo no município de Barueri**, SP. Memnon Edições Científicas, pg 89-98, 2015.
- CASTRO, Margaret; MOREIRA, Ayrton C. Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 47, n. 4, p. 358-367, 2003.

CHAMBERLAIN, R.S., & HERMAN, B.H. (1990). A novel biochemical model linking dysfunctions in brain melatonin, proopiomelanocortin peptides, and serotonin in autism. **Biological Psychiatry**, 28, 773–793.

CHO, Dong-Yeon; KIM, Yoo-Ah; PRZYTYCKA, Teresa M. Network biology approach to complex diseases. *PLoS computational biology*, v. 8, n. 12, 2012.

CORBETT, B.A., Mendoza, S., Abdullah, M., Wegelin, J.A., & Levine, S. (2006). Cortisol circadian rhythms and response to stress in children with autism. **Psychoneuroendocrinology**, 31, 59–68.

CORBETT, B.A., Mendoza, S., Wegelin, J.A., Carmean, V., & Levine, S. (2008). Variable cortisol circadian rhythms in children with autism and anticipatory stress. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, 33, 227–234.

CORBETT, Blythe A. et al. Comparing cortisol, stress, and sensory sensitivity in children with autism. **Autism Research**, v. 2, n. 1, p. 39-49, 2009.

CUNHA, Jurema Alcides et al. **Manual da versão em português das Escalas Beck**. São Paulo: Casa do psicólogo, p. 11-13, 2001.

DAVIS, Elysia P.; SANDMAN, Curt A. The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. **Child development**, v. 81, n. 1, p. 131-148, 2010.

DETH, Richard et al. How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 190-201, 2008.

DIPIETRO, Janet A. The role of prenatal maternal stress in child development. **Current Directions in Psychological Science**, v. 13, n. 2, p. 71-74, 2004.

GALINHA, Iolanda Costa; PEREIRA, Cicero Roberto; ESTEVES, Francisco. Versão reduzida da escala portuguesa de afeto positivo e negativo-PANAS-VRP: Análise fatorial confirmatória e invariância temporal. **Psicologia**, v. 28, n. 1, p. 50-62, 2014.

GANONG, W. F., 1991. Endocrine functions of the pancreas. In: Ganong WF. **Review of Medical Physiology**. Hartford: Appleton & Lange. pp. 312-333.

GARCIA, Aline Helen Corrêa et al. Transtornos do espectro do autismo: avaliação e comorbidades em alunos de Barueri, São Paulo. **Psicologia: teoria e prática**, v. 18, n. 1, p. 166-177, 2016.

GARDE, A. H.; HANSEN, Å. M. Long-term stability of salivary cortisol. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 65, n. 5, p. 433-436, 2005.

GRABRUCKER, Andreas M. Environmental factors in autism. **Frontiers in psychiatry**, v. 3, p. 118, 2013.

GRANGER, D. A., HIBEL, L. C., FORTUNATO, C. K., & KAPELEWSKI, C. H. (2009). Medication effects on salivary cortisol: Tactics and strategy to minimize impact in behavioral and developmental science. **Psychoneuroendocrinology**, 34(10), 1437-1448.

GRIFFITHS, B. B.; HUNTER, R. G. Neuroepigenetics of stress. **Neuroscience**, v. 275, p. 420-435, 2014.

HENIKOFF, Steven; MATZKE, Marjori A. Exploring and explaining epigenetic effects. **Trends in Genetics**, v. 13, n. 8, 1997.

HERBERT, Martha R. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. **Current opinion in neurology**, v. 23, n. 2, p. 103110, 2010.

HINDORFF, L. A. et al. Multifactorial Inheritance and Complex Diseases 39. **Emery and Rimoin's Essential Medical Genetics**, v. 166, n. 5, p. 38, 2013.

HUTZ, C. S.; GIACOMONI, C. H. A mensuração do Bem-Estar Subjetivo: **Escala de Afeto Positivo e Negativo e Escala de Satisfação de Vida** [Resumo]. In: Trabalho apresentado no XXVI Congresso Interamericano de Psicologia, São Paulo: SP. 1997.

IWATA, Keiko et al. Investigation of the serum levels of anterior pituitary hormones in male children with autism. **Mol Autism**, v. 2, p. 16, 2011.

KAHN, R. Etiology of Autism: The Possible Role of Cortisol. **The University of Rockies**, 2011, 67 pages.

KANNER, Leo et al. Autistic disturbances of affective contact. publisher not identified, 1943.

KINNEY, Dennis K. et al. Prenatal stress and risk for autism. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 8, p. 1519-1532, 2008.

KIRSCHBAUM, Clemens; PIRKE, K.-M.; HELLHAMMER, Dirk H. The 'Trier Social Stress Test'—a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. **Neuropsychobiology**, v. 28, n. 1-2, p. 76-81, 1993.

KUBOTA, Takeo; MIYAKE, Kunio; HIRASAWA, Takae. Epigenetic understanding of geneenvironment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics. **Clin Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 1, 2012.

LEVI, **Matthew N. Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. xvi, 1082 p. ISBN 97885352136762008; 321:208–209.

LI, Jiong et al. A nationwide study on the risk of autism after prenatal stress exposure to maternal bereavement. **Pediatrics**, v. 123, n. 4, p. 1102-1107, 2009.

LIPP, Marilda Emmanuel Novaes. **Manual do inventário de sintomas de stress para adultos de Lipp (ISSL)**. São Paulo: Casa do Psicólogo, v. 76, 2000.

LIPP, MARILDA NOVAES. Stress e o turbilhão da raiva. **Casa do Psicólogo**, 2005.

LUCASSEN, P. J. et al. Prenatal stress reduces postnatal neurogenesis in rats selectively bred for high, but not low, anxiety: possible key role of placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **European journal of Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 97-103, 2009.

MA, Dengke K. et al. Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 1338-1344, 2010.

MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI, Milica; NESTOROVIC, Nataša; MILOŠEVIĆ, Verica. Prenatal glucocorticoids: short-term benefits and long-term risks. **diabetes**, v. 27, p. 29, 2012.

MARKHAM, Julie A.; KOENIG, James I. Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. **Psychopharmacology**, v. 214, n. 1, p. 89-106, 2011.

NELSON, R. J., 2000. **An Introduction to Behavioral Endocrinology** (2nd Edition). Sinauer, New York, NY.

O'DONNELL, K.; O'CONNOR, T. G.; GLOVER, V. Prenatal stress and neurodevelopment of the child: focus on the HHA axis and role of the placenta. **Developmental neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 285-292, 2009.

PERRONE-MCGOVERN, Kristin; SIMON-DACK, Stephanie; NICCOLAI, Lindsay. Prenatal and perinatal factors related to autism, IQ, and adaptive functioning. **The Journal of genetic psychology**, v. 176, n. 1, p. 1-10, 2015.

PORTO, R.F. Intercorrências e estressores psicológicos na gestação de mães de indivíduos com transtornos do espectro do autismo. 2011. Dissertação (**Mestrado em Distúrbios do Desenvolvimento**) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2011.

PORTO, R.F.; BRUNONI, D. Transtornos do Espectro do Autismo: intercorrências perinatais *in* Contribuições para a inclusão escolar de alunos com necessidades especiais: **Estudos interdisciplinares em educação e saúde em alunos com Transtorno do Espectro do Autismo no município de Barueri**, SP Editores: MEF D'Antino; D Brunoni; JS Schwartzman; pp 32-41. Memnon Edições Científicas, São Paulo, 2015.

PROVENÇAL, Nadine; BINDER, Elisabeth B. The effects of early life stress on the epigenome: from the womb to adulthood and even before. **Experimental neurology**, v. 268, p. 10-20, 2015.

ROSA, Thais Gonçalves. **INFLUÊNCIA DOS AGENTES ESTRESSORES NO AUMENTO DOS NÍVEIS DE CORTISOL PLASMÁTICO**. Disponível em:

< <http://www.unirv.edu.br/conteudos/fckfiles/files/INFLUENCIA%20DOS%20AGENTES%20ESTRESSORES%20NO%20AUMENTO%20DOS%20NIVEIS%20DE%20CORTISOL%20PLASMATICO.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2018.

SANCHES, Cristiane Prugovechi; BRUNONI, Décio. Intercorrências Perinatais em Indivíduos com Transtornos Invasivos do Desenvolvimento: Uma Revisão. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v. 10, n. 1, p. 21-31, 2010.

SCHREIER, Hannah MC et al. Mercury and psychosocial stress exposure interact to predict maternal diurnal cortisol during pregnancy. **Environmental Health**, v. 14, n. 1, p. 28, 2015.

STRUNECKA, Anna. Regulation of Cortisol Levels in Autistic Individuals and their Mothers. **Cellular and Molecular Biology of Autism Spectrum Disorders**, p. 186, 2011.

SZYF, Moshe. The early life social environment and DNA methylation: DNA methylation mediating the long-term impact of social environments early in life. **Epigenetics**, v. 6, n. 8, p. 971-978, 2011.

TALGE, Nicole M.; NEAL, Charles; GLOVER, Vivette. Antenatal maternal stress and long term effects on child neurodevelopment: how and why?. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 48, n. 3.4, p. 245-261, 2007.

USTAD, Mahiboob et al. MULTIFACTORIAL DISEASE BIOMARKER DATABASE. **International Journal**, v. 1, n. 5, 2013.

VAN DEN BERG, Agnes E.; CUSTERS, Mariëtte HG. Gardening promotes neuroendocrine and affective restoration from stress. **Journal of health psychology**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2011.

WALKER, Jamie J.; TERRY, John R.; LIGHTMAN, Stafford L. Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 277, n. 1688, p. 1627-1633, 2010.

WATSON, David; CLARK, Lee A.; TELLEGEN, Auke. Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. **Journal of personality and social psychology**, v. 54, n. 6, p. 1063, 1988.

WEAVER, Ian CG et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847-854, 2004.

WELBERG, Leonie AM; SECKL, Jonathan R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. **Journal of neuroendocrinology**, v. 13, n. 2, p. 113-128, 2001.

**Contatos:** [debruno46@gmail.com](mailto:debruno46@gmail.com) e [leomendoncaarantes@gmail.com](mailto:leomendoncaarantes@gmail.com)

