

SEROTONINA PLAQUETÁRIA COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE AUTISMO

PILAR QUINHONES LEVY, MANUEL PIRES BICHO

Laboratório de Genética. Faculdade de Medicina de Lisboa. Universidade de Lisboa

RESUMO

O nível de serotonina plaquetária foi determinada por método de radioimunoensaio (RIA), num grupo de doentes autistas e num grupo de controlo. Foram estudados trinta e seis doentes autistas (28 do sexo masculino e 8 do sexo feminino) todos com atraso mental profundo, e um grupo de controlo de 23 indivíduos (12 do sexo masculino e 11 do sexo feminino). Os níveis de serotonina foram significativamente mais elevados nos doentes (média \pm desvio padrão) (88,37 mmol/dl \pm 40,38) do que no grupo de controlo (49,54 mmol/dl \pm 16,49). Não se verificaram diferenças significativas tanto nos doentes como no grupo de controlo entre os vários grupos etários e sexo. A hiperserotoninemia esteve presente em 70 % dos doentes autistas. Pretendeu-se demonstrar a importância dos níveis de serotonina plaquetária como marcador biológico de autismo, a correlação eventual entre o nível de serotonina e a etiologia do autismo, assim como do benefício do seu fácil doseamento por métodos de RIA.

SUMMARY

SEROTONIN PLATELET LEVELS AS A BIOLOGICAL MARKER FOR AUTISM

Platelet levels of serotonin were determined by a quantitative direct radioimmunoassay, in a group of autistic patients and a control group. Thirty six autistic patients (28 males and 8 females), all with severe mental retardation, and a group of 23 matched controls, were studied. The serotonin levels in autistic patients (Mean \pm SD) (88.37 mmol/dl \pm 40.38) were significantly higher than in the control group (49.54 mmol/dl \pm 16.49). There were no significant differences in levels between the sexes and age groups among subjects in the patient and the control groups. We detected a hyperserotoninaemia in 70 % of the autistic patients. We also discuss correlations between serotonin levels in our patients with known aetiologies and levels quoted in the literature and propose RIA to be used as a quick, easy and reliable method for the analysis of large numbers of samples.

INTRODUÇÃO

O autismo é um síndrome cuja etiopatogenia é ainda em parte desconhecida, sendo por vezes expressão de situações médicas, genéticas e não genéticas. A complexidade da sua sintomatologia tem levado a uma vasta investigação clínica e laboratorial.

A presença de doenças genéticas associadas ou responsáveis pelo autismo está bem estabelecida, sendo importante detectá-las de modo a se poder efectuar um aconselhamento genético correcto e eventualmente providenciar uma terapêutica (Gilberg e Coleman, 1992).

A serotonina foi identificada no cérebro dos mamíferos na década de 50 (Twarog e Page, 1953). Estudos pos-

teriores vieram demonstrar as semelhanças entre as plaquetas e os neurónios cerebrais que contêm 5-Hidroxi-triptamina (5-HT), tornando as plaquetas num modelo laboratorial adequado para o estudo da função dos neurotransmissores. As plaquetas acumulam, armazenam e libertam serotonina de um modo análogo aos sinaptosomas centrais serotoninérgicos (Born, 1988; Da Prada, Cesura, Launay, e Richards, 1988; Wirz-Justice, 1988; Pletscher, 1988; Paasonen, 1968).

Em 1961 Schain e Freedman detectaram pela primeira vez o aumento de serotonina no sangue em 30 % de doentes autistas. Cook em 1990 num artigo de revisão da neuroquímica do autismo, salientou que a alteração bioquímica mais consistente encontrada foi de que cerca

de 25% dos doentes tinham uma hiperserotoninemia. Esta alteração era familiar, sendo colocada a hipótese por alguns autores de que um aumento consistente intrafamiliar da serotonina significaria uma associação com factores genéticos ou uma predisposição para o autismo, aumentando portanto o risco de repetição (Cook, 1990; Piven, Tsai, Nehme, Coyle, Chase e Folstein, 1991; Kupperma, Beegly, Burns, Tsai 1985; Leventhal, Cook, Moford, Ravitz e Freedman, 1990; Abramson, Wright, Carpenter, Brennan, Lumpuy, Cole e Young, 1989). A existência de hip ou hiperserotoninemia num doente autista leva à necessidade de serem rastreados os síndromes já conhecidos como associados a esta patologia, apesar de o número escasso de casos descritos não permitir avaliar prevalências (Quadro I).

Quadro I – Doenças associadas ao autismo, com valores alterados de serotonina

Hiperserotoninemia

- Hipotiroidismo congénito
- Rubéola congénita
- Esclerose tuberosa
- Síndrome de Williams
- Espasmos infantis

Hiposerotoninemia

- Trissomia 21
- Fenilcetonúria (não tratada)
- Síndrome de Cornelia deLange

Alguns artigos referem a relação entre os níveis de 5-HT e a existência de uma função imunológica anormal, em doentes autistas, seus pais e irmãos, este achado vem aumentar a importância da serotonina como um possível marcador para o autismo (Abramson, Self, Genco, Smith, Pendleton, Valentine, Wright e Cuccaro, 1990).

Os níveis de serotonina podem ser influenciados por alguns factores como o ritmo diurno e sazonal, demonstrado por alguns autores (Healy, O'Halloran, Carney, e Leonard, 1986; Wirz-Justice, Lichtsteiner e Feer, 1977) mas não por outros (Yuwiler, Ritvo, Bald, Kipper, e Koper, 1971; Chiodi, Paris, e Casacchia, 1981); o sexo, sugerido por uns (Ortiz Artigas e Gelpi, 1988; Le Quan Bui, 1984) mas não confirmado por outros (Badcock, Spence e Stem, 1987; Yuwiler, Plotkin, Geller e Ritvo, 1970; Goldsmith, Feinstein, Munson, Reiss, e Borengasser-Cardoso, 1986; Flachaire, Berrey, Berthier, Salandre, Quincy, e Renaud, 1990); a idade com a referência de uma hiperserotoninemia nos recém-nascidos e idosos (Flachaire, Berrey, Berthier, Salandre, Quincy, e Renaud, 1990; Guicheney, 1988; Barradas, Gill, Fonseca, Mikhailidis, e Dandona, 1988) mas não presente nas crianças e restantes adultos (Badcock, Spence e Stern, 1987; Goldsmith, Feinstein, Munson, Reiss, e Borengasser-Cardoso, 1986; Guicheney, 1988; Rogeness, Nitchell, Clister, et al., 1985). A eventual influência da dieta foi excluída por Anderson et al., 1985.

A associação do autismo a alterações do metabolismo da serotonina principalmente a hiperserotoninemia, tem levado a ensaios terapêuticos com drogas agonistas da serotonina como a fluoxetina, fenfluramina e fluvoxamina. Os resultados são controversos, no entanto, alguns autores referem mudanças favoráveis em áreas comportamentais como a auto-agressão, agitação, labilidade emocional, estereotipias, níveis cognitivos e agressão. (Benfeld e Ward, 1986; Markowitz, 1990; Mandoki, 1992; Riddle, King, Hardin, Scahill, Ort, Chappell, Ras-musson, e Leckman, 1990/1991; Goldsmith, Feinstein, Munson, Reiss, Borengasser, Wright e Cheng, 1985; Ghaziusddin, Tsai e Guaziuddin, 1991; Mehlinger, Schettner e Poznansky, 1990).

É nossa opinião que o uso de fármacos no tratamento de doentes autistas deve ser limitado a casos comportamentais graves, no entanto na presença de hiperserotoninemia, os fármacos que a aumentariam ainda mais devem ser evitados, favorecendo os já citados.

MATERIAL E MÉTODOS

Doentes e controlos

- 36 doentes autistas (28 do sexo masculino, e oito do sexo feminino). Os doentes foram classificados pelo DSM-IV (American Psychiatric Association), 30 com critérios de autismo e seis com critérios de perturbação global do desenvolvimento não especificada de outro modo, que inclui o autismo atípico.
- Grupo de controlo de 23 (12 do sexo masculino e 11 do sexo feminino).

A idade foi compreendida entre os 11 e os 34 anos de idade.

Os doentes e grupo de controlo foram divididos em grupos etários de 5/5 anos para o ajuste da idade.

As colheitas de sangue foram efectuadas de Janeiro a Abril, e entre as 11 e 13 horas do dia, de modo a evitar eventual influência de factores como o ritmo diurno e sazonal. A dieta era inespecífica com a excepção de três doentes com fenilcetonúria, que faziam dieta pobre em fenilalanina.

Todos os doentes eram apoiados por uma associação para doentes autistas.

Técnica utilizada

Colheita de 5-10 ml de sangue em tubo com EDTA, mantido em gelo.

Para o isolamento de plaquetas foi utilizado o método preconizado por Vieira, Azevedo e Manso, 1987.

Dentro de 1-1.30 h da colheita de sangue:

1. Centrifugar a 800 rpm durante 10 min a 4°C, para obtenção de plasma rico em plaquetas;
2. Repetir centrifugação duas vezes, a segunda a 4000 rpm, para obtenção de botão de plaquetas;
3. Lavar botão de plaquetas por duas vezes com soro fisiológico gelado;

4. Lisar, adicionando 0,5 ml de sacarose 0,3 m, misturar;
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 min, repetir;
6. Ressuspender; Duplicar as amostras;
7. Guardar a -20 °C até efectuar doseamento de serotonina.

O doseamento de serotonina plaquetária foi efectuado por radioimunoensaio utilizando o *kit* da Imuno Biological Laboratories (IBL). A metodologia foi a aconselhada pelo fabricante.

RESULTADOS

Os níveis de serotonina foram significativamente ($p=0,000$) mais elevados nos doentes (média \pm desvio padrão) (88,37 mol/dl \pm 40,38) do que no grupo de controlo (49,54 mmol/dl \pm 16,49). A hiperserotoninemia (média \pm 2DP) esteve presente em 70 % dos doentes autistas (*Quadro II*; *Fig. 1*).

Não houve qualquer diferença entre idade ou sexo, nos doentes e grupo de controlo.

O nível de serotonina dos doentes com etiologia conhecida é apresentado no *Quadro III*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A importância dos neurotransmissores nas doenças neuropsiquiátricas, particularmente no autismo tem sido largamente divulgada.

Quadro II – Níveis de serotonina – mmol/l

	n.º	Média mmol/dl	Desvio padrão
Autistas*	36	88,37	40,38
Controlos**	23	49,54	16,49

*/** - $p = 0,000$

Quadro III – Níveis de serotonina em doentes com etiologia conhecida – mmol/l

Síndrome X-Frágil	43,43	Normal
Fenilcetonúria-1	125,1	>2DP
Fenilcetonúria-2	57,23	Normal
Fenilcetonúria-3	35,59	Normal
Rubéola congénita	118,28	<2DP
Toxoplasmose congénita	114,6	<2DP
Encefalite sarampo	2,93	<2DP
Espasmos infantis	109,25	<DP
XXY	111,39	<2DP

Pretendeu-se demonstrar neste estudo a importância dos níveis de serotonina plaquetária como marcador biológico de autismo, a correlação eventual entre o nível de serotonina e a etiologia do autismo, assim como do benefício do seu doseamento por métodos de RIA.

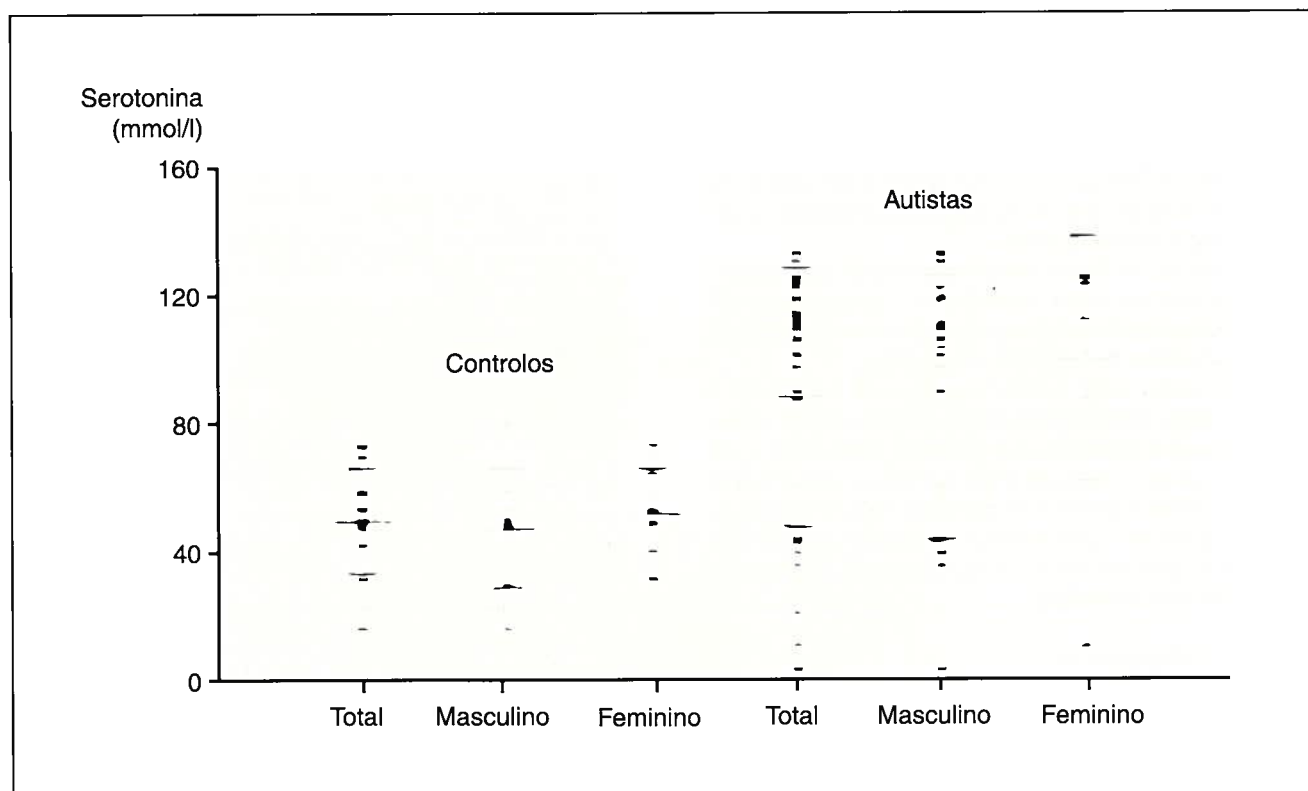


Fig. 1 – Expressão dos níveis de serotonina «Autistas Vs Controlos» Total, Masculino e Feminino.

Os métodos de RIA utilizados neste estudo demonstraram resultados sobreponíveis aos obtidos por HPLC, sendo os primeiros, disponíveis em Kit, mais fáceis de utilizar, permitindo a obtenção de um grande número de doseamentos de um modo rápido e rigoroso.

Este estudo, é inédito em Portugal, tendo sido demonstrada a sobreposição em parte, entre os casos publicados e a realidade em Portugal. 70 % dos doentes autistas tinham valores elevados de serotonina, acima da média mais 2DP.

A obtenção de valores de controlo na nossa população é essencial não só ao conhecimento do que é a normalidade mas também ao estudo da patologia. O conhecimento da associação de alterações da serotoninemia (hiper ou hipo) a determinadas etiologias do autismo, pode ajudar no futuro ao seu diagnóstico. Os casos publicados na literatura são poucos, sendo portanto até à data impossível saber prevalências. O conhecimento da etiologia do autismo é essencial para o aconselhamento genético, por exemplo, os riscos de repetição para um casal com um filho autista podem variar desde 2-3 % para o autismo de etiologia desconhecida até 25-50 % para doenças mendelianas (Rutter, 1990).

Dos três doentes com fenilcetonúria estudados, dois tinham valores de fenilalanina entre 9 e 12 mg e a serotonina foi de 57,23 mmol/dl (normal) e outro de 125,10 mmol/dl (+ 2DP) o doente que mantém valores altos de fenilalanina de 18 mg obteve um valor de serotonina de 35,59 mmol/dl o que se situa nos valores inferiores do normal. Estes resultados contrariam em parte a noção de que os doentes fenilcetonúricos em dieta correcta terão valores normais de serotonina. McKean propôs que existe uma relação estreita entre o comportamento e os valores de serotonina, mas como era de prever todos os doentes melhoraram o seu comportamento com a dieta pobre em fenilalanina, é de notar que o doente com valores altos de fenilalanina e valores normais de serotonina mantém alterações graves do seu comportamento, cumprindo irregularmente a dieta.

Pretende-se no futuro alargar este estudo aos familiares de doentes, de modo a estudar se a existência de níveis elevados intrafamiliares poderá ser acompanhado de um risco genético de repetição aumentado.

Nos doentes com valores elevados de serotonina e que necessitem efectuar terapêutica farmacológica, deverão ser evitados fármacos que elevem a serotonina e privilegiados os que a baixem, visto que em alguns casos os doentes puderam manifestar melhoria do seu comportamento. Alguns dos nossos doentes com hiperserotoninemia e alterações graves do comportamento irão iniciar terapêutica com fluoxetina.

AGRADECIMENTOS

- À Associação Portuguesa de Protecção aos Deficientes Autistas, toda a colaboração prestada pelos jovens, familiares e pessoal.
- À Sra D. Gabriela Fontes a excelente colaboração técnica.

- À consulta do Serviço de Pediatria (especialmente às suas enfermeiras) e ao Laboratório de Química Clínica (Dir: Dra. M. João Pereira Miguel) do Hospital de Santa Maria, a colaboração imprescindível para a obtenção de controlos saudáveis.
- Ao Laboratório Lilly Farma, a oferta dos kits para doseamento da serotonina.

BIBLIOGRAFIA

- ABRAMSON RK, WRIGHT HH, CARPENTER R, BRENNAN W, LUMPY O, COLE E, YOUNG SR: Elevated serotonin in autistic probands and their first-degree relatives. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 1989;19:397-407.
- ABRAMSON RK, SELF S, GENCO P, SMITH N, PENDLETON A, VALENTINE J, WRIGHT HH, CUCCARO M, POWELL D: The relationship between lymphocyte cell surface markers and serotonin in autistic probands. *Am J Human Genetics* 1990;47 (3 supp) A45-(0171).
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: DSM-IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4^o ed.) Washington, DC.
- ANDERSON GM, FEIBEL FC, WETLAUFER LA, SCHLICHT KR, ORT SM, COHEN DJ: Effect of meal on human whole blood serotonin. *Gastroenterology* 1995;88:86-9.
- BADCOCK NR, SPENCE JG, STERN LM: Blood serotonin levels in adults, autistic and non-autistic children with a comparison of different methodologies. *Anna of Clinical Biochemistry* 1987;24:625-34.
- BARRADAS MA, GILL DS, FONSECA VA, MIKHAILIDIS DP, DANDONA P: Intraplatelet serotonin in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease. *Eur J Clinical Investigation* 1988;18:399-404.
- BENFIELD P, WARD A: Fluvoxamine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depressive illness. *So Drugs* 1986;32/4:313-34.
- BORN GVR: Platelets and neurobiological research. *Experientia* 1988;44:113-5.
- CHIODI F, PARIS L, CASACCHIA M: Variations in blood serotonin during antiepileptic therapy. *Bollettino Societa Italiana Biologia Sperimentale* 1981;57:2372-6.
- COOK EH: Autism: review of neurochemical investigation. *Synapse* 1990;6:292-308.
- Da PRADA M, CESURA AM, LAUNAY JM, RICHARDS JG: Platelets as a model for neurones? *Experientia* 1988;44:115-251.
- FLACHAIRE E, BERREY C, BERTHIER A, SALANDRE J, QUINCY C, RENAUD B: Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults, and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. *Clin Chemistry* 1990;36(12):2117-20.
- GHAZIUSDDIN M, TSAI L, GUAZIUDDIN N: Fluoxetine in autism with depression. *Journal of the Am Acad of Child Adolescent Psychiatry* 1991;30(3):508-9.
- GILBERG C, COLEMAN M: The biology of the Autistic Syndromes. 2nd Ed. Mac Keith Press 1992;115-30.
- GUICHENEY P: Human platelet serotonin content: Methodological aspects and physiological variations. *Methods Find. Experimental Clinical Pharmacology* 1988;10:253-258.
- GOLDSMITH BM, FEINSTEIN C, MUNSON S, REISS A, BORENGASSER M, WRIGHT G, CHENG L K: The effects of fenfluramine on blood serotonin in autism 1985;31(6):1012.
- GOLDSMITH BM, FEINSTEIN C, MUNSON S, REISS A, BORENGASSER-CARDOSO MA: Determination of a reference range for whole blood serotonin in a paediatric population using high pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *Clinical Biochemistry* 1986;19:359-63.
- GOW IF, CORRIE JET, WILLIAMS BC, EDWARDS CRW: Development and validation of an improved radioimmunoassay for serotonin in platelet-rich plasma. *Chimica Acta* 1987;175-88.
- HEALY D, O'HALLORAN A, CARNEY PA, LEONARD BE: Variations in platelet 5-hydroxytryptamine in control and depressed populations. *J Psychiatry Research* 198;20:345-53.
- KUPPERMA A, BEEGLY JHL, BURNS TL, TSAI, LY: Serotonin relationship of autistic probands and their first-degree relatives. *J Am Acad of Child Adolescent Psychology* 1985;24:186-90.
- Le QUAN BUI KH, PLAISANT O, LEBOYER M: Reduced platelet serotonin in depression. *Psychiatry Research* 1984;13:129-39.

- LEVENTHAL BL, COOK EH, MORFORD M, RAVITZ A, FEEDMAN DX: Relationship of whole blood serotonin and plasma norepinephrine within families. *J Autism and Developmental Disorders* 1990;20:499-512.
- MANDOKI MW: Fluoxetine in the treatment of adolescents with behaviour problems. *Biological Psychiatry* 1992;31:108A.
- MARKOWITZ PI: The effect of fluoxetine on self-injurious behaviour in the developmentally disabled: a preliminary study. *J Clinical Pharmacology* 1990;12(1):27-31.
- McKEAN CM: Effects of totally synthetic low phenylalanine diet on an adolescent phenylketonuric patients. *Archives of Disease in Childhood* 1971;46:608-15.
- MEHLINGER R, SCHETTNER W, POZNANSKY E: Fluoxetine and autism. *Journal of the American Academy of Child Adolescent Psychiatry* 1990;29(6):985.
- ORTIZ J, ARTIGAS F, GELPI E: Serotonergic status in human blood. *Life Science* 1988;43:983-90.
- PAASONEN MK: Platelets 5-hydroxytryptamine as a model in pharmacology. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiae Fenniae*, 1968;46:416-222.
- PIVEN J, TSAI G, NEHME E, COYLE JT, CHASE GA, FOLSTEIN SE: Platelet serotonin, a possible marker for familial autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 1991;21:51-60.
- RIDDLE MA, KING RA, HARDIN MT, SCAHILL L, ORT SI, CHAPPELL C, RASMUSSEN A, LECKMAN JF: Behavioral side effects of fluoxetine in children and adolescents. *J Child and Adolescent Psychopharmacology*, 1990/91;193-6.
- ROGENESS GA, NITCHELL EL, CLISTER GT, e col.: Comparison of whole blood serotonin and platelet MAO in children with schizophrenia and major depressive disorders. *Biological Psychiatry* 1985;20:270-5.
- RUTTER M: Autism as a genetic disorder: «The new genetics of mental illness». Stoneham Ma: Butterworth Heinemann 1990;225-482.
- SCHAIN RJ, FREEDMAN DX: Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J Pediatrics* 1961;58:315-20.
- TWAROG BM, PAGE IH: Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Ame J Physiology* 1953;175:157-61.
- VIEIRA RX, AZEVEDO MS, MANSO C: Monoaminoxidase (MAO) das plaquetas e comportamento suicida em doentes deprimidos. *Arquivos Portugueses de Ciências Biológicas* 1987;21(1):63-76.
- WIRZ-JUSTICE A: Platelets research in psychiatry. *Experientia* 1988;44:145-152.
- WIRZ-JUSTICE A, LICHTSTEINER M, FEER H: Diurnal and seasonal variations in human platelet serotonin in man. *JNeural Transmission* 1977;41:7-15.
- YUWILER A, PLOTKIN S, GELLER E, RITVO E: A rapid accurate procedure for the determination of serotonin in whole human blood. *Biochemical Medicine* 1970;3:426-31.
- YUWILER A, RITVO ER, BALD D, KIPPER D, KOPER A: Examination of circadian rhythmicity of the blood serotonin and platelets in autistic and non-autistic children. *J Autism and Childhood Schizophrenia* 1971;1:421-35.