

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Mayara Moniz Vieira Pinto

**ANÁLISE DA SALIVA DE INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM TRANSTORNO
DO ESPECTRO AUTISTA POR FT-IR E ELISA**

São José dos Campos
2022

Mayara Moniz Vieira Pinto

**ANÁLISE DA SALIVA DE INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM TRANSTORNO
DO ESPECTRO AUTISTA POR FT-IR E ELISA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador (a): Profa. Dra. Emília Angela Lo Schiavo Arisawa

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

São José dos Campos, SP
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Pinto, Mayara Moniz Vieira

Análise da saliva de indivíduos diagnosticados com transtorno do espectro autista por FT-IR e ELISA / Mayara Moniz Vieira Pinto; orientadora, Emília Angela Lo Schiavo Arisawa; co-orientador Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2022.

1 CD-ROM, 113 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

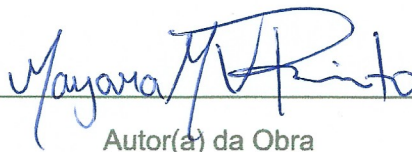
1. Engenharia Biomédica. 2. transtorno do espectro autista. 3. espectroscopia. 4. biomarcadores. 5. ELISA. I. Arisawa, Emília Angela Lo Schiavo, orient. II. Raniero, Leandro José, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Mayara Moniz Vieira Pinto, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 28 de Abril de 2022.


Autor(a) da Obra

MAYARA MONIZ VIEIRA PINTO

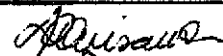
**“ANÁLISE DA SALIVA DE INDIVÍDUOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA
POR FT-IR E ELISA”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

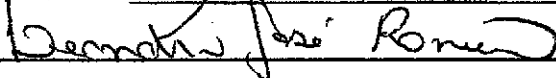
PROF.ª DR.ª FERNANDA PUPIO SILVA LIMA



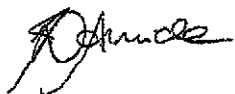
PROF.ª DR.ª EMILIA ANGELA LO SCHIAVO ARISAWA



PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO



PROF.ª DR.ª JANETE DIAS ALMEIDA (Unesp)



Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 09 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por estar sempre presente, ter permitido esta oportunidade em minha vida e por ter me dado saúde e força de superação.

Aos meus pais, Benedito Carlos Neves Pinto e Clarisse Moniz Vieira Pinto, pelo apoio, paciência e incentivo, sem eles nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Débora Vieira Akatsu dos Santos e Gustavo Viera Akatsu, que sempre me incentivaram na minha vida profissional e pessoal. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas e pelo carinho.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Emília Angela Lo Schiavo Arisawa, por acreditar nesse trabalho, por sua orientação, por todos os ensinamentos, todo suporte profissional e pessoal, pelo grande apoio e compreensão sempre manifestado e pela inestimável amizade.

Ao meu co-orientador, Prof Dr. Leandro José Raniero, pela confiança, paciência e ensinamentos nessa trajetória.

Às equipes do grupo GAIA e da clínica Integratta Integrativa, em especial a Marla Rodrigues Gomes e Marcela Garbi Pastore, e a todos os voluntários e seus familiares, pela confiança, oportunidade e ajuda fundamental na realização desse projeto.

A Renata Falchete do Prado, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), por todos os seus conhecimentos e pelo apoio na avaliação da lactoferrina salivar pela técnica de ELISA, e ao Vitor Gabriel Poli de Lima, do Laboratório de Nanossensores do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), pelo apoio e na realização da técnica de FTIR

À Universidade do Vale do Paraíba – Univap, e ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, por proporcionar um excelente curso de mestrado, desde a secretaria por meio da Miriam e Nancy, até o corpo docente. Especialmente a Priscila Maria Sarneiro Correa Marciano Leite, responsável pela Central de Laboratórios Multiusuários, pela ajuda durante as análises do projeto.

A todos que diretamente e indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

RESUMO

Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem de desenvolvimento neurológico, de difícil diagnóstico. Pesquisas avaliam o uso da espectroscopia aplicada à análise de fluidos orgânicos, como a saliva. Este estudo objetivou avaliar a eficácia da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) como ferramenta para o diagnóstico precoce de TEA em amostras de saliva, comparada ao teste imunoenzimático (ELISA) para quantificação da lactoferrina. Foram analisadas amostras de saliva de 38 voluntários, 19 TEA (Grupo A) e 19 Neurotípicos (Grupo N). Após centrifugação, 20 µL de sobrenadante foi depositado sobre janelas de fluoreto de cálcio (CaF₂) e desidratado por 10 min. Os espectros FT-IR foram obtidos por espectrofotômetro acoplado a um microscópio, no intervalo espectral de 4000 - 900 cm⁻¹, com 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm⁻¹. Foram coletados 304 espectros e suas médias submetidas à análise de segunda derivada e deconvolução de bandas. A amostra apresentou predomínio do sexo masculino e equilíbrio entre as faixas etárias. No grupo A, houve predomínio de partos prematuros, idade materna avançada e prevalência de doenças pré-natais. Nos indivíduos com TEA, a idade média para diagnóstico era 5,3 ± 2,2 anos e o início da intervenção foi de 4,4 ± 1,4 anos. Os resultados do teste imunoenzimático não apresentaram significância estatística. Com relação a Espectroscopia FT-IR, os resultados permitiram verificar diferentes bandas de absorção e amplitude de suas áreas, para ambos os grupos. No grupo A, foram encontradas cinco bandas, 1521, 1570, 1599, 1684 e 1735 cm⁻¹, ausentes nos espectros do grupo N, enquanto que as bandas 1493, 1515 e 1582 cm⁻¹ foram encontradas somente nos espectros do grupo N, regiões que correspondem, respectivamente, a proteínas, amida II, amida I e estiramento C=O de ésteres de lipídios. Em relação a amplitude das áreas, a banda 1667 cm⁻¹ apresentou maior área no grupo A, enquanto as bandas 1543 e 1637 cm⁻¹ apresentaram maior área no grupo N. Conclui-se que a Espectroscopia FT-IR é uma ferramenta promissora para o diagnóstico precoce de Transtorno do Espectro Autista em amostras de saliva, identificando alterações na composição desse fluido, principalmente proteínas, entre indivíduos diagnosticados com TEA e neurotípicos.

Palavras-chave: transtorno do espectro autista; espectroscopia; FT-IR; biomarcadores; estudo clínico; saliva; lactoferrina; ELISA.

Salivary analysis of individuals diagnosed with Autism Spectrum Disorder by FT-IR and ELISA

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurological development disorder that is difficult to diagnose. Research evaluates the use of spectroscopy applied to the analysis of organic fluids, such as saliva. This study aimed to evaluate the effectiveness of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) as a tool for the early diagnosis of ASD in saliva samples, compared to the enzyme immunoassay (ELISA) for quantification of lactoferrin. Saliva samples from 38 volunteers, 19 ASD (Group A) and 19 Neurotypical (Group N) were analyzed. After centrifugation, 20 μL of supernatant was deposited on calcium fluoride (CaF_2) windows and dehydrated for 10 min. The FT-IR spectra were obtained using a spectrophotometer coupled to a microscope, in the spectral range of $4000 - 900 \text{ cm}^{-1}$, with 32 scans and spectral resolution of 4 cm^{-1} . A total of 304 spectra were collected and their averages were submitted to second derivative analysis and band deconvolution. The sample showed a predominance of males and balance between age groups. In group A, there was a predominance of premature births, advanced maternal age and prevalence of prenatal diseases. In subjects with ASD, the mean age at diagnosis was 5.3 ± 2.2 years and the start of the intervention was 4.4 ± 1.4 years. The results of the enzyme immunoassay did not show statistical significance. Regarding FT-IR Spectroscopy, the results allowed to verify different absorption bands and amplitude of their areas, for both groups. In group A, five bands were found, 1521 , 1570 , 1599 , 1684 and 1735 cm^{-1} , absent in the spectra of the N group, while the bands 1493 , 1515 and 1582 cm^{-1} were found only in the spectra of the N group, regions corresponding, respectively, to proteins, amide II, amide I and C=O stretch of lipid esters. In relation to the amplitude of the areas, the band 1667 cm^{-1} presented greater area in the group A, while the bands 1543 and 1637 cm^{-1} presented greater area in the group N. It is concluded that FT-IR Spectroscopy is a promising tool for the early diagnosis of Autism Spectrum Disorder in saliva samples, identifying changes in the composition of this fluid, mainly proteins, among individuals diagnosed with ASD and neurotypical.

Key-words: autism spectrum disorder; spectroscopy; FT-IR; biomarkers; clinical study; saliva; lactoferrin; ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização anatômica das três maiores glândulas salivares: parótida, sublingual e submandibular.....	33
Figura 2 - Mecanismos de transporte de componentes do plasma para a glândula salivar. a) Transporte Ativo. b) Difusão Passiva. c) Filtração Simples. d) Bombardeamento ativo de Na ⁺ para dentro do ducto pelas células acinares. e) Bombardeamento de Na ⁺ pelas células ductais de volta para o sangue. f) Membrana celular. g) Poro membranar. h) Espaço intracelular. i) Célula acinar.	34
Figura 3- Estrutura química da Lactoferrina.	40
Figura 4 – Espectro eletromagnético e regiões no infravermelho próximo (NIR), médio (MID) e distante (FAR).	42
Figura 5- Espectro eletromagnético e a excitação molecular.	44
Figura 6 – Exemplo de espectro de transmitância.	45
Figura 7 – Exemplo de espectro de absorbância.	45
Figura 8 - Modos vibracionais para a molécula de CO ₂ (acima) e para o grupo funcional –CH ₂ (abaixo). Os sinais + e - indicam os movimentos perpendiculares ao plano da página.	49
Figura 9 – Espectros médios FT-IR de saliva, registrados a 4000 – 900 cm ⁻¹ , com suas principais bandas de absorção e caracterizações aproximadas de componentes salivares.	51
Figura 10 – Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR.	54
Figura 11 - Média ± DP da concentração de lactoferrina do grupo N e A, obtidos por ELISA.	64
Figura 12 - Gráfico dos espectros médios das amostras de saliva, dos grupos N e A, obtidos pela técnica de Espectroscopia FT-IR.	65
Figura 13 - Segunda derivada dos espectros médios das amostras de saliva dos grupos	65
Figura 14 - Fórmulas das principais moléculas da saliva, onde se observam sua estrutura química e os tipos de ligações.	69
Figura 15 - Deconvolução de bandas da região 922 - 1803 cm ⁻¹ de espectros FT-IR da saliva dos grupos N e A.....	70

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1– Passo a passo do processo de coleta salivar desenvolvido para indivíduos com TEA.	58
Fluxograma 2– Processamento da amostra para análise FT-IR. 2A) posição correta para a coleta da saliva. 2B) saliva coletada no tubo estéril de 1,5 mL. 2C) equipamento de centrifugação CF 16RN-Hitachi. 2D) divisão do sobrenadante e precipitado na saliva. 2E) agitador vórtex. 2F) janelas de fluoreto de cálcio (CaF ₂). 2G) Concentrador Eppendorf 5301. 2H) Espectrofotômetro Spectrum 400, acoplado a um microscópio (Perkin-Elmer, Spotlight 400).	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais funções da saliva e seus componentes.	38
Quadro 2 - Modos vibracionais e atribuições dos componentes salivares na região infravermelha.....	52
Quadro 3 - Características com relação a gestação e partos dos grupos N e A.	63
Quadro 4 - Valores de área obtidos na deconvolução de bandas e atribuição dos modos vibracionais e das principais moléculas presentes na saliva.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

as	Vibrações assimétricas
s	Vibrações simétricas
v	Vibrações de estiramento
δ	Vibrações de deformação angular
ADDM	Rede de Monitoramento de Deficiências de Desenvolvimento e Autismo
ATR	Reflectância Total Atenuada
CaF ₂	Fluoreto de cálcio
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK	Creatina-fosfoquinase
CNV	Variantes do número de cópias
DHEA	Hormônio Desidroepiandrosterona
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DP	Desvio Padrão
DSM-V	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª edição
DMS-IV	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 4ª edição
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EUA	Estados Unidos da América
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAIA	Grupo de Apoio ao Indivíduo com Autismo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IL	Interleucina
IR	Radiação Infravermelha
kDa	Quilodalton
LCT	Lactotransferrina
LT	Lactoferrina
NHIS	Pesquisa Nacional de Entrevistas em Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde

QI	Quociente de Inteligência
SIgA	Imunoglobulina A salivar
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNV	Variantes de nucleotídeos únicos
SOD	Superóxido dismutase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNIVAP	Universidade do Vale do Paraíba

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Hipótese	14
1.2 Justificativa.....	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Transtorno do Espectro Autista	17
3.1.1 <i>Epidemiologia</i>	20
3.1.2 <i>Etiologia</i>	22
3.1.3 <i>Diagnóstico e intervenções precoces</i>	24
3.2 Biomarcadores	26
3.2.1 <i>Marcadores de estresse oxidativo</i>	28
3.2.2 <i>Marcadores de disfunção mitocondrial</i>	29
3.2.3 <i>Marcadores de desregulação imunológica</i>	30
3.2.4 <i>Aminoácidos e neurotransmissores</i>	30
3.2.5 <i>Marcadores hormonais</i>	31
3.2.6 <i>Análises proteômicas</i>	32
3.3 Saliva	32
3.3.1 <i>Potencial diagnóstico da saliva</i>	38
3.4 Lactoferrina: estrutura e funções	40
3.4.1 <i>Lactoferrina como biomarcador de Transtorno do Espectro do Autista</i>	41
3.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	42
3.5.1 <i>Vibrações moleculares e modos vibracionais</i>	47
3.5.2 <i>Análise da saliva por espectroscopia no infravermelho</i>	50
3.5.3 <i>Instrumentação</i>	53
4 METODOLOGIA	55
4.1 Critérios de inclusão	55
4.2 Critérios de exclusão	56
4.3 Coleta de dados.....	56
4.4 Coleta salivar	57
4.5 Análise da saliva por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	58
4.6 Teste imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays - ELISA)	59
4.7 Análise estatística	60
5 RESULTADOS	61
5.1 Caracterização dos participantes	61

5.2 Teste imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays - ELISA)	64
5.3 Análise da saliva por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	64
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	101
APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO	104
APÊNDICE C – QUESTIONÁRIOS PARA INDIVÍDUOS COM TEA	107
APÊNDICE D – QUESTIONÁRIOS PARA INDIVÍDUOS NEUROTÍPICOS	110
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	112

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem de desenvolvimento neurológico, caracterizada por déficit na comunicação, interação social, aprendizagem e por padrões restritos e repetitivos de comportamento, como movimentos contínuos, interesses fixos e hipo ou hiper-reatividade a estímulos sensoriais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Tais características variam na maneira como se manifestam e no grau de intensidade, estando presente de maneira bastante particular em mais de um indivíduo e influenciando como cada portador se relaciona, expressa e comporta (GUEDES; TADA, 2015). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em 2016, a prevalência estimada de TEA era de 1 em 54 crianças com 8 anos de idade, afetando quatro vezes mais meninos do que meninas, com prevalência igual em caucasianos e afrodescendentes e menor para indivíduos de origem hispânica (MAENNER *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, detectou-se aumento significativo do diagnóstico de TEA, tornando-a uma grande preocupação na saúde pública (BRENTANI *et al.*, 2013). O diagnóstico do TEA é difícil e complexo, realizado por equipe multidisciplinar, a partir da investigação e observação clínica do comportamento do indivíduo. Entretanto, não existem exames ou marcadores biológicos que confirmem, isoladamente, seu diagnóstico (ASSUMPÇÃO JUNIOR; KUCZYNSKI, 2011). A identificação tardia do TEA retarda o início das intervenções terapêuticas e farmacológicas específicas, que contribuem para o desenvolvimento biopsicossocial e possibilitam melhor prognóstico para o indivíduo (ELDEVIK *et al.*, 2009).

Estudos sugerem que fatores genéticos, ambientais, inflamatórios, imunológicos e metabólicos desempenham papel proeminente nesse distúrbio (MARCHEZAM, 2018). Diversas técnicas estão sendo pesquisadas a fim de estabelecer um protocolo de diagnóstico fácil, rápido e econômico. Entre essas, destacam-se os biomarcadores e técnicas de espectroscopia aplicadas à análise de amostras de sangue, urina, fio de cabelo e saliva (BJØRKLUND *et al.*, 2018).

A saliva é um fluido biológico que apresenta diversas funções, tais como proteção e limpeza da mucosa oral, ações antibacterianas e de digestão. Novas técnicas diagnósticas utilizam esse fluido pela presença de marcadores capazes de detectar inúmeras doenças orais e sistêmicas, bem como monitorar sua evolução (ZHANG *et al.*, 2016a). Contém a maioria dos componentes do sangue e ambos são

funcionalmente equivalentes (RODRIGUES *et al.*, 2017), sendo de enorme relevância a sua utilização para diagnóstico de diversos distúrbios, como TEA. Sua coleta é fácil, rápida, de baixo custo, envolvendo técnicas não invasivas e sem uso de materiais perfuro cortantes (PANDEY *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2017). Além disso, a coleta da saliva gera menos estresse em pacientes diagnosticados com TEA (PUTNAM *et al.*, 2012).

Uma das ferramentas para análise dos componentes biomoleculares da saliva é a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), que permite identificar, qualitativamente e quantitativamente, mudanças na estrutura, composição e concentração de seus componentes (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009; LI *et al.*, 2012). Uma das grandes vantagens dessa técnica é a identificação de componentes em uma mistura desconhecida em diferentes estados físicos da matéria (AHMED *et al.*, 2010). Permite, ainda, análise rápida, não destrutiva, sem necessidade de uso de grandes quantidades de amostra e de reagentes (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015). A aplicação do FT-IR para análise de saliva humana tem sido reconhecida como uma técnica promissora e vantajosa visando ao diagnóstico de diversas patologias e, possivelmente, do TEA (CARVALHO *et al.*, 2018; KHAUSTOVA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2017).

1.1 Hipótese

Considerando os resultados obtidos em estudos científicos sobre diagnóstico de doenças pela análise de biomarcadores presentes na saliva, o potencial da Espectroscopia FT-IR para análise de diversos fluidos biológicos, bem como a busca por novos métodos de diagnóstico de indivíduos com Transtorno do Espectro Autista, sugere-se que seja possível detectar alterações nos componentes desse biofluido pela análise comparativa por Espectroscopia FT-IR de material coletado de indivíduos com e sem diagnóstico desse transtorno.

1.2 Justificativa

A necessidade de diagnóstico menos subjetivo, mais preciso e confiável para o Transtorno do Espectro Autista estimulou inúmeros estudos a pesquisarem marcadores biológicos e alterações genéticas, entre outros, para esse distúrbio.

Entretanto, não há consenso em relação aos possíveis biomarcadores para diagnóstico e suas concentrações em indivíduos com TEA. Além disso, os estudos realizados utilizam biomarcadores específicos, geralmente plasmáticos, por meio de kits imunoenzimáticos, testes genéticos e outras técnicas, que apresentam custos elevados.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a composição bioquímica da saliva de indivíduos diagnosticados com TEA, comparando-os com os de indivíduos neurotípicos, utilizando a técnica de Espectroscopia FT-IR e com intuito de identificar possíveis biomarcadores para diagnóstico de TEA, tornando este estudo inédito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a efetividade da Espectroscopia FT-IR como ferramenta para o diagnóstico precoce de Transtorno do Espectro Autista em amostras de saliva.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente a saliva de indivíduos diagnosticados com TEA e neurotípicos, a fim de detectar diferenças de expressão de biomarcadores;
- Correlacionar os resultados das análises de saliva por Espectroscopia FT-IR, com as concentrações de Lactoferrina por ELISA;
- Analisar subgrupos do TEA em relação a sexo, idade e fatores de risco para o transtorno.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Transtorno do Espectro Autista

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits persistentes na comunicação e na interação social e por padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014)

A sintomatologia do TEA está associada a alterações neurológicas, porém se manifesta como características comportamentais (HYMAN; LEVY; MYERS, 2020), que podem durar a vida inteira. Essas características compreendem dificuldades na reciprocidade socioemocional, nas habilidades para estabelecer relacionamentos duradouros, na comunicação verbal e não verbal e na aprendizagem. Também pode estar presentes movimento motores, comportamentos e fala estereotipados, hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum por aspectos sensoriais do ambiente, e hábitos, rotinas e rituais comportamentais inflexíveis, que se quebrados causam ansiedade e sofrimento ao indivíduo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BUENO *et al.*, 2019; GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004).

Um aspecto importante do TEA é que os sintomas se apresentam de forma e em graus diferentes, dependendo do indivíduo, da idade, nível de linguagem e habilidades cognitivas (HYMAN; LEVY; MYERS, 2020; JOHNSON *et al.*, 2007). Dessa forma, enquanto algumas pessoas com autismo podem viver de forma independente, outras têm deficiências graves e requerem cuidados e apoio para toda a vida (WHO, 2021)

Independente da intensidade dos sintomas, eles limitam ou prejudicam significativamente o funcionamento diário, nos âmbitos social, escolar, profissional, familiar ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo, mesmo que a idade em que esse prejuízo fica evidente varie de acordo com características do indivíduo, seu ambiente e aspectos culturais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; LORD *et al.*, 2020)

As principais características do TEA estão evidentes desde o início da infância, principalmente, nos primeiros anos da vida escolar, mas podem não se manifestar plenamente até que seja necessário o convívio em sociedade. Isso ocorre, especialmente, durante segundo ano de vida (12 a 24 meses), porém podem ser vistos antes dos 12 meses de idade, se os atrasos do desenvolvimento forem graves, ou

após os 24 meses, se os sintomas forem mais brandos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; NASCIMENTO; LIMA; MORAES, 2021).

Ao longo da vida, intervenções e a aquisição de mecanismos compensatórios podem mascarar essas dificuldades pelo menos em alguns contextos. Os sintomas, entretanto, ainda causam prejuízos recentes consideráveis (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BARGIELA; STEWARD; MANDY, 2016).

Um diferencial desse transtorno, em relação a outros, é a ocorrência de um período de regressão do desenvolvimento ou perda de habilidades, com declínio gradual ou rápido no uso de linguagens e nas interações sociais. Isso pode afetar 20% das crianças com TEA, ocorrendo especialmente durante os três primeiros anos de vida. Em casos raros, pode ocorrer também na adolescência (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; AUTISM SPEAKS, 2017).

Além de ser um distúrbio isolado, o TEA pode estar associado a diversas condições neurológicas, psiquiátricas, de desenvolvimento e genéticas, que influenciam no prognóstico do indivíduo com TEA (HASHEM *et al.*, 2020). Cerca de 70% desses indivíduos podem ter um transtorno mental comórbido e 40% podem ter dois ou mais transtornos mentais comórbidos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Um dos principais transtornos associados é a deficiência intelectual, caracterizada em indivíduos com $QI \leq 70$, presente entre 30 a 50% das crianças com TEA. Outras condições comuns, também classificadas como transtornos do neurodesenvolvimento, são: transtorno do desenvolvimento da coordenação, transtornos específicos de aprendizagem e/ou transtornos da comunicação, sendo estimado que um terço desses indivíduos são não-verbais ou se comunicam em algum grau, com auxílio de dispositivos de comunicação (ALMEIDA *et al.*, 2018; AUTISM SPEAKS, 2017; LYALL *et al.*, 2017).

Alguns sintomas psiquiátricos não pertencem aos critérios de diagnóstico, porém estão muito presentes nesses indivíduos, como a ansiedade, a depressão e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Estima-se que cerca de 30 a 61% das crianças com TEA apresentam TDAH e 11 a 40% apresentam transtorno de ansiedade (ALMEIDA *et al.*, 2018; AUTISM SPEAKS, 2017). Além disso, segundo pesquisas, quase dois terços das crianças autistas entre 6 e 15 anos foram vítimas de *bullying*, principalmente no ambiente escolar, aumentando a propensão de desenvolver problemas de saúde mental (AUTISM SPEAKS, 2017).

Por sua vez, condições médicas como epilepsia, distúrbios do sono e distúrbios gastrointestinais, geralmente dolorosos, são frequentemente associadas ao autismo, se estendendo por toda a vida do indivíduo. A epilepsia geralmente está associada a maior deficiência intelectual e menor capacidade verbal (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004).

Além disso, pesquisas apontam que mais da metade das crianças com TEA têm um ou mais problemas crônicos de sono; têm quase 8 vezes mais probabilidade de sofrer de um ou mais problemas gastrointestinais crônicos do que crianças neurotípicas; e até um terço delas tem epilepsia, sendo maior naqueles que apresentam deficiência intelectual associada, que persiste na fase adulta (ALMEIDA *et al.*, 2018; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; AUTISM SPEAKS, 2017).

A insistência em rotinas e a aversão à mudança, bem como sensibilidades sensoriais, podem interferir também na alimentação e no sono e tornar os cuidados de rotina extremamente difíceis, especialmente para a família (ALMEIDA *et al.*, 2018; GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004)

Outras condições comportamentais muito associadas são impulsividade, irritabilidade, isolamento social, agressão e acessos de raiva (BJØRKLUND *et al.*, 2020; BUEMO *et al.*, 2019). É comum também apresentar comportamentos autolesivos, como bater a cabeça, morder o braço e coçar a pele, estando presente em quase 28% das crianças com 8 anos, e um maior risco de mortalidade (AUTISM SPEAKS, 2017).

Uma característica que se apresenta com bastante frequência no TEA é o transtorno alimentar restritivo e evitativo, e preferências alimentares extremas e reduzidas, que podem persistir durante a vida (ALMEIDA *et al.*, 2018; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Essa rigidez alimentar, em combinação com o uso de diversos medicamentos psiquiátricos, pode levar ao sobrepeso e obesidade nessa população. Cerca de 32% de crianças autistas de 2 a 5 anos estão com sobrepeso e 16% estão obesos, aumento de 9% e 6%, respectivamente, em relação a população em geral (AUTISM SPEAKS, 2017).

Na última década, o aumento de estudos sobre TEA na idade adulta observou perda na qualidade de vida ao longo do tempo e relatou que apenas uma minoria autista vive e trabalha de forma independente e remunerada, sendo mais comum entre aqueles com capacidades comunicativas e intelectuais superiores, com maior

facilidade para enfrentar mudanças e que fazem terapias e tratamentos medicamentosos desde o início dos sintomas (LYALL *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2020).

3.1.1 Epidemiologia

Nas últimas décadas, o aumento do diagnóstico de TEA fez com que esse transtorno se tornasse um grande desafio para a saúde pública e para a sociedade. De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição (DSM-V), a prevalência do TEA nos Estados Unidos da América (EUA) e em outros países alcançou 1% da população, incluindo crianças e adultos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Já a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima a prevalência internacional de TEA em 0,62% ou 1 em cada 160 crianças (WHO, 2021).

Por sua vez, relatório da Rede de Monitoramento de Deficiências de Desenvolvimento e Autismo (ADDM), publicado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em 2016, realizou vigilância ativa em 11 estados dos EUA e estimou em 1,85% a prevalência de TEA, ou 1 em 54 crianças com 8 anos de idade. Relatórios anteriores publicados nos anos de 2000, 2008, 2012 e 2014 identificaram prevalência em crianças de, respectivamente, 0,67% ou 1 em 150; 1,14% ou 1 em 88; 1,47% ou 1 em 68; e 1,69% ou 1 em 59 (MAENNER *et al.*, 2020).

Outro estudo recente analisou os dados coletados na Pesquisa Nacional de Entrevistas em Saúde (NHIS) nos EUA, entre os anos de 2014 e 2016, e estimou a prevalência de TEA em 2,47% entre adolescentes e crianças (HASHM *et al.*, 2020).

Uma questão importante está relacionada ao sexo. Segundo a Rede ADDM, a incidência de TEA é 4,3 vezes maior em meninos, 1 em cada 34, do que em meninas, 1 em 144 (MAENNER *et al.*, 2020).

A razão para esse fato ainda não está bem esclarecida, porém estudos sugerem que mulheres com sintomas característicos de TEA apresentam alto risco de não receberem diagnóstico clínico, de serem diagnosticadas de forma incorreta ou de receberem diagnóstico tardio em relação aos homens, impedindo intervenção precoce e melhor prognóstico (BARGIELA; STEWARD; MANDY, 2016; JOHNSON *et al.*, 2007; LOOMES; HULL; MANDY, 2017).

Essa discrepância no diagnóstico ocorre devido à falta de compreensão do fenótipo feminino, as diferenças nos sintomas, maior compensação das dificuldades

realizada pelas mulheres e pelo preconceito do TEA como transtorno masculino. (BARGIELA; STEWARD; MANDY, 2016; WILSON *et al.*, 2016).

De acordo com Frazier *et al.* (2014), alguns estudos relataram que as meninas têm mais sintomas de sociocomunicação e menor capacidade cognitiva e de linguagem (CARTER *et al.*, 2007; LORD; SCHOPLER; REVICKI, 1982). Outros estudos concordaram na maior dificuldade de comunicação desse grupo, porém relataram que elas são menos prejudicadas no domínio dos interesses restritos e comportamentos repetitivos do que os meninos (HARTLEY; SIKORA, 2009; SOLOMON *et al.*, 2012; WILSON *et al.*, 2016).

Dessa forma, é importante estabelecer como esse fator influencia a apresentação do TEA, pois isso tem implicações para a compreensão da biologia do TEA em ambos os sexos e tem implicações para o desenho do serviço e atendimento clínico (JOHNSON *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2016).

Já em relação etnia, a rede ADDM relatou maior prevalência de TEA entre grupos mais favorecidos socioeconomicamente e entre crianças classificadas como caucasianas. Entretanto, nesse último relatório, as estimativas de prevalência foram aproximadamente idênticas para caucasianos, afrodescendentes e asiáticos (18,5%, 18,3% e 17,9%, respectivamente), mas menor para crianças hispânicas (15,4%). Essa redução das diferenças pode indicar progresso em direção à detecção aprimorada de TEA entre todas as crianças (MAENNER *et al.*, 2020).

Embora não tenha sido detectada nenhuma diferença geral na prevalência de TEA entre crianças afrodescendentes e caucasianas de 8 anos, as disparidades para crianças negras e hispânicas persistiram, tanto na avaliação quanto no diagnóstico precoce de TEA, uma vez que essas são menos propensas a ter avaliação precoce comparadas às crianças caucasianas com TEA (40% versus 45%). Além disso, é mais provável que apresentem deficiência intelectual (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; MAENNER *et al.*, 2020).

Em relação a idade de diagnóstico, embora o número de diagnósticos de TEA em crianças tenha aumento ao longo do tempo, as descobertas da rede ADDM sugeriram pouca mudança geral na idade média desse diagnóstico, com prevalência entre 50 e 56 meses (MAENNER *et al.*, 2020).

Nesse sentido, é possível observar o aumento do diagnóstico de TEA. Entretanto, ainda não está claro se esse aumento está relacionado a expansão dos critérios diagnósticos, com frequentes revisões do diagnóstico e Manual Estatístico de

Transtornos Mentais (DSM), associado ao aprimoramento das ferramentas analíticas, melhores métodos de identificação e triagem; a maior conscientização entre pais e profissionais da saúde; a diferenças na metodologia dos estudos epidemiológicos; ou aumento real na frequência do transtorno (NASCIMENTO; LIMA; MORAES, 2021; RICE *et al.*, 2012)

Independente da razão, esse transtorno tornou-se um grande desafio para a saúde pública, uma vez que afeta a vida familiar. Além disso, o cuidar dos indivíduos com TEA requer recursos econômicos substanciais por parte do governo e da comunidade, pois os cuidados de saúde dessa população são complexos e envolvem diversos serviços integrados desenvolvidos de acordo com a necessidade individual (AUTISM SPEAKS, 2017; HYMAN; LEVY; MYERS, 2020; LYALL *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2020; WHO, 2021)

A colaboração entre o setor da saúde e outros setores, especialmente educação, emprego e assistência social, também são essenciais, principalmente na prestação de apoio a adultos, que podem não funcionar de forma independente, e a seus responsáveis, que apresentam maior probabilidade de não trabalharem fora e terem perda da receita familiar (HYMAN; LEVY; MYERS, 2020; NASCIMENTO; LIMA; MORAES, 2021; RICE *et al.*, 2012).

Com isso, métodos de avaliação e identificação precoce de TEA entre as crianças continuam a ser metas importantes de saúde pública, para permitir a instituição de tratamentos precoces e mais eficazes, favorecendo a um melhor prognóstico (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; MAENNER *et al.*, 2020).

3.1.2 Etiologia

A etiologia exata do TEA ainda é desconhecida, entretanto, diversos estudos propõem que uma causa multifatorial, com influência tanto de fatores genéticos quanto ambientais para o desenvolvimento desse transtorno, originando-se nas fases pré-natal e perinatal (HASHIM *et al.*, 2020; LYALL *et al.*, 2017).

Estudos com gêmeos e suas famílias demonstraram que o autismo apresenta contribuição genética particularmente elevada, com herdabilidade estimada variando entre 37 a 90%, aproximadamente (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

Os fatores genéticos são responsáveis por cerca de 10 a 30% dos diagnósticos de TEA, estando associados a mutações genéticas causais identificadas (ALMEIDA *et al.*, 2018; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; VARCIN; JESTE, 2017), como anomalias cromossômicas, síndromes genéticas, esclerose tuberosa, síndrome do X frágil e defeitos estruturais do genoma, que incluem desde alterações de pares de bases específicos, também chamadas de variantes de nucleotídeos únicos (SNV), até deleções ou duplicações de vários pares de bases, chamados de variantes do número de cópias (CNV), entre outras (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Embora essas variações tenham impacto sobre caminhos moleculares específicos que podem levar a distintas apresentações clínicas, as várias funções de muitas dessas variantes genéticas também se relacionam na regulação de processos fundamentais do desenvolvimento cerebral inicial, como organização cortical, estrutura e função da sinapse, conectividade e equilíbrio excitação/inibição (VARCIN; JESTE, 2017)

Esses fatores ambientais podem interagir com o genoma por meio de mecanismos epigenéticos. Porém, os fatores genéticos, por si só, são insuficientes para identificar completamente a origem desse transtorno. Por isso, a sua interação com fatores ambientais, a chamada epigenética, permitiria explicar a grande heterogeneidade dos sintomas do TEA (ALMEIDA *et al.*, 2018; VARCIN; JESTE, 2017).

Os principais fatores ambientais consistem em idade parental avançada, parto prematuro, baixo peso ao nascer, infecções congênitas e diversas exposições pré-natal e perinatal, como exposição prolongada a medicamentos, como ácido valproico, poluentes ambientais (agentes oxidantes, metais pesados, herbicidas e pesticidas), fotossensibilizadores, luz ultravioleta ou radiação ionizante, que estão associados com risco aumentado de TEA (ALMEIDA *et al.*, 2018; BJØRKLUND *et al.*, 2020; VARCIN; JESTE, 2017).

Essa relação entre genética e ambiente pode, também, provocar respostas imunológicas e inflamatórias no cérebro, uma vez que a maioria das mutações genéticas estão ligadas à regulação de processos fundamentais do desenvolvimento cerebral inicial, como organização cortical, estrutura e função da sinapse, conectividade e equilíbrio excitação/inibição, entre outros. Desse modo, a relação entre esses dois fatores pode ser um fator essencial para a compreensão da

fisiopatologia do TEA e, nos últimos anos, tornou-se assunto de intensas pesquisas (BJØRKLUND *et al.*, 2020; VARCIN; JESTE, 2017).

3.1.3 Diagnóstico e intervenções precoces

Em 2013, a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) foi publicada, atualizando os critérios diagnósticos para TEA da 4ª edição (DSM-IV). Nesse novo manual, o conceito de “espectro” foi criado (ALVES; MONTEIRO; SOUZA, 2020; HODGES; FEALKO; SOARES, 2020; LYALL *et al.*, 2017). Esse termo é utilizado pois as manifestações do transtorno variam muito dependendo da gravidade da condição autista, do nível de desenvolvimento, da idade e de intervenções e apoios atuais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014)

Além disso, engloba transtornos antes chamados de autismo infantil precoce, autismo infantil, autismo de Kanner, autismo de alto funcionamento, autismo atípico, transtorno global do desenvolvimento sem outra especificação, transtorno desintegrativo da infância e transtorno de Asperger (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; LORD *et al.*, 2018). A síndrome de Rett não pertence mais à mesma categoria diagnóstica, mas é uma das causas genéticas do TEA (SILVA *et al.*, 2020)

No DSM-V, também, foi inserido descritores de nível de gravidade, a fim de ajudar categorizar o nível de suporte necessário para um indivíduo com TEA (HODGES; FEALKO; SOARES, 2020).

No geral, a maioria dos estudos sugere que o DSM-V fornece maior especificidade e menor sensibilidade em comparação com o DSM-IV. Portanto, pelo novo instrumento, o diagnóstico de TEA apresenta maior confiabilidade, embora se observe um expressivo número de crianças cujo diagnóstico de TEA não é possível, particularmente adolescentes, adultos ou aqueles com um diagnóstico anterior de outros transtornos, como já citados anteriormente. No entanto, o número de pessoas que seriam diagnosticadas sob o DSM-IV, mas não sob o novo DSM-V, parece estar diminuindo ao longo do tempo, provavelmente devido à maior conscientização e melhor documentação de comportamentos (ALVES; MONTEIRO; SOUZA, 2020; HODGES; FEALKO; SOARES, 2020; NASCIMENTO; LIMA; MORAES, 2021).

No diagnóstico do transtorno do espectro autista, as características clínicas individuais são registradas por meio do uso de especificadores (AMERICAN

PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BRASIL, 2014). Esses podem descrever a presença ou ausência de comprometimento intelectual e/ou de linguagem e os sintomas apresentados por cada indivíduo, como idade dos primeiros sintomas, intensidade dos sintomas, perdas de habilidades já estabelecidas, como habilidades sociais ou linguísticas, entre outros, realizando, assim, um diagnóstico mais individualizado (AUTISM SPEAKS, 2017; BRASIL, 2014).

Considerando que os sintomas mudam durante o desenvolvimento do indivíduo, o diagnóstico mais válido e confiável é realizado a partir de múltiplas fontes de informação, tanto retrospectivas quanto atuais, incluindo observações clínicas do indivíduo, por equipe multidisciplinar, entrevistas com cuidadores, questionários e, quando possível, autorrelato (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; HODGES; FEALKO; SOARES, 2020). Assim, é possível obter a história completa e detalhada do desenvolvimento desse indivíduo. Entretanto, quanto mais nova for a criança, mais inespecíficos são os sintomas, dificultando diagnóstico específico (BRASIL, 2014).

Outra desvantagem do diagnóstico clínico é que se baseia em sistemas de classificação que consideram alguns princípios psicopatológicos, observados nos casos em que os diagnósticos são listados por categorias ou escalas, de acordo com seus variados graus e acometimentos. Com isso, define-se um conjunto específico de sintomas característicos para uma determinação diagnóstica. No entanto, essa forma de diagnosticar apresenta algumas limitações, visto que existe grande diversidade de características dentro de um mesmo transtorno e, frequentemente, não é padronizada e globalizada (PEREIRA; RIESGO; WAGNER, 2008).

Em relação a gravidade do transtorno, o TEA possui 3 níveis de gravidade, levando em consideração a comunicação social e os comportamentos restritivos e repetitivos. A distinção clínica se baseia no tipo, na frequência e na intensidade do comportamento (BUOMO *et al.*, 2019).

Uma característica importante para determinar um diagnóstico diferencial é o comportamento disruptivo e desafiador de indivíduos com TEA em relação a outros transtornos, e a sua maior propensão a desenvolver ansiedade e depressão (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; LORD *et al.*, 2020).

A identificação precoce do TEA permite a instauração imediata de intervenções que têm como funções melhorar o desenvolvimento do indivíduo em relação ao aprendizado, a comunicação e as habilidades sociais, bem como o desenvolvimento

subjacente do cérebro, podendo, também, reduzir a necessidade de apoio educacional e comportamental na escola primária e no restante da vida (BRASIL, 2014; NASCIMENTO; LIMA; MORAES, 2021; SILVA *et al.*, 2020).

Os tipos de intervenções usadas mudam ao longo da vida e incluem: intervenções psicossociais mediadas pelos pais e/ou administradas por terapeutas na infância; estratégias baseadas na escola; técnicas para promover a independência na idade adulta; terapias farmacológicas, para tratar alguns dos sintomas associados ao autismo, como irritabilidade, e comorbidades, como ansiedade (BRASIL, 2014; SILVA *et al.*, 2020).

Além disso, as intervenções precoces são extremamente importantes para o prognóstico dos indivíduos com autismo, pois nos primeiros anos de vida, o cérebro apresenta maior plasticidade de suas estruturas anatômicas e fisiológicas, apresentando maior funcionamento das conexões neuronais e, conseqüentemente, facilitando a formação psicossocial (BRASIL, 2014; NASCIMENTO; LIMA; MORAES, 2021).

Com isso, é possível perceber a importância do diagnóstico precoce como fator importante para maior integração desse indivíduo à sociedade, com menor nível de estresse e, conseqüentemente, maior qualidade de vida.

3.2 Biomarcadores

Considerando a importância do diagnóstico precoce do TEA, diversas técnicas estão sendo pesquisadas a fim de encontrar alterações em fluídos corporais e testes genéticos que permitam alcançar esse objetivo. Entre essas, destacam-se os biomarcadores, que são indicadores objetivos de processos biológicos ou fisiopatológicos, como fatores genéticos, imunológicos e bioquímicos, ou de respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas (FRYE *et al.*, 2019; MARCHEZAN *et al.*, 2019; SCHRIEFER; CARVALHO, 2008).

Esses marcadores, quando acoplados à história clínica e exame físico do indivíduo, possuem diversas aplicações, dentre elas é possível citar: o diagnóstico precoce de doenças; a definição de subgrupos de uma doença por meio da classificação de sua gravidade; indicação de prognóstico e previsão ou monitoramento da resposta terapêutica a tratamento específico (ANDERSON, 2015; FRYE *et al.*, 2019; KOHARA, 2016; SCHRIEFER; CARVALHO, 2008).

O diagnóstico do TEA é difícil e complexo, realizado por equipe multidisciplinar por meio da investigação e observação clínica do comportamento do indivíduo (GALIANA-SIMAL *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2021). No entanto, atualmente não existem testes biológicos ou marcadores específicos que podem identificar processos fisiopatológicos e confirmar esse diagnóstico (ASSUMPÇÃO; KUCZYNSKI, 2011; FRYE *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2021).

Isso dificulta a identificação precoce do TEA e, conseqüentemente, retarda o início de intervenções terapêuticas e farmacológicas específicas, que contribuem para o desenvolvimento biopsicossocial e possibilitam melhor prognóstico para o indivíduo (ELDEVIK *et al.*, 2009; GALIANA-SIMAL *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2021). O desconhecimento da etiologia é outro fator que dificulta a descoberta de biomarcadores para essa condição (MARCHEZAN *et al.*, 2019).

Atualmente, diversas pesquisas promissoras revelaram processos biológicos anormais associados ao TEA, sendo possível a sua medição por meio de biomarcadores. Isso torna esses indicadores essenciais na prática clínica para um diagnóstico rápido, fácil, preciso, econômico e precoce, além de apresentarem grande potencial na seleção de tratamentos eficazes (ANDERSON, 2015; FRYE *et al.*, 2019).

O plasma ainda é o material mais utilizado para análise de biomarcadores devido à alta concentração de marcadores presentes neste material. Entretanto, a saliva vem sendo bastante estudada, uma vez que contém a maioria dos componentes do sangue e ambos são funcionalmente equivalentes (MOTA *et al.*, 2020; PINTO *et al.*, 2021).

Diversos biomarcadores estão sendo estudados para diagnóstico de TEA, utilizando amostras de sangue, urina, fio de cabelo e saliva, incluindo marcadores genéticos, como DNA e miRNA, bioquímicos, microbiológicos, hormonais, morfológicos, neurofisiológicos, imunológicos e inflamatórios (ALZGHOUL *et al.*, 2019; BJØRKLUND *et al.*, 2018; KOHARA, 2016; MARCHEZAM, 2018; MOTA *et al.*, 2020).

Estudos sugerem uma ligação entre TEA e disfunções de fatores metabólicos e inflamatórios, especialmente aqueles relacionados à neuroinflamação e estresse hormonal, bem como a alterações imunológicas, enzimáticas, mitocondriais, oxidativas e tóxicas (BORIS *et al.*, 2007; GHALEIHA *et al.*, 2015; MARCHEZAN *et al.*, 2019).

Vários estudos detectaram níveis alterados de diferentes marcadores em fluidos corporais de indivíduos com TEA, em comparação com controles, que causam

repercussões no cérebro. Esses marcadores serão melhores detalhados nas secções posteriores.

3.2.1 Marcadores de estresse oxidativo

O estresse oxidativo desempenha papel relevante na interação entre fatores ambientais, genéticos e imunológicos, afetando o cérebro, especialmente de crianças, durante a parte inicial do desenvolvimento (BJØRKLUND *et al.*, 2020; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006).

Esse parâmetro pode ser detectado por meio da análise das enzimas antioxidantes, como a glutathione, e da peroxidação lipídica (AL-GADANI *et al.*, 2009; FRUSTACI *et al.*, 2012; GOLDANI *et al.*, 2014).

A glutathione é o principal antioxidante responsável pela proteção contra estresse oxidativo, neuroinflamação e dano mitocondrial, além de regular vias de desintoxicação. Ela pode ser medida como glutathione reduzida, glutathione oxidada ou a razão entre glutathione reduzida e oxidada (GHANIZADEH *et al.*, 2012; VALI *et al.*, 2007).

Alguns estudos realizados com indivíduos autistas mostraram níveis aumentados da expressão do superóxido dismutase (SOD), da glutathione oxidada e da peroxidação lipídica associados à diminuição do antioxidante glutathione (AL-GADANI *et al.*, 2009; GOLDANI *et al.*, 2014). O estudo de Khemakhem *et al.* (2017) demonstrou alterações no piruvato, creatina quinase, complexo 1, caspase 7 e lactato desidrogenase, além da glutathione S-transferase.

Al-Gadani *et al.* (2009) também sugeriram que a formação de espécies reativas de oxigênio poderia atuar como segundo mensageiro na ativação de diversas reações indutoras de lesão cerebral, como perda de células de Purkinje e aumento do volume cerebral, induzindo o transtorno autista (KERN; JONES, 2006; VARCIN; JESTE, 2017).

Além disso, os autores notaram nesse mesmo estudo que o aumento das espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica poderiam estar correlacionadas à disfunção mitocondrial, uma vez que essa última se refere à degradação oxidativa das membranas celulares (GOLDANI *et al.*, 2014; PINTO *et al.*,

2021). Eles observaram, também uma diminuição do nível de vitamina E, que é um antioxidante que protege as membranas celulares da oxidação.

Geier et al. (2009) estudaram os metabólitos da transulfuração em indivíduos com TEA e neurotípicos, incluindo a glutatona e seus derivados e observaram aumento do estresse oxidativo e diminuição da capacidade de desintoxicação em indivíduos com TEA, validando esses metabólitos como possíveis biomarcadores diagnósticos.

Baixos níveis de glutatona podem estar associados a muitos dos sintomas autistas, resultantes de várias alterações, tais como: aumento do estresse oxidativo, peroxidação lipídica e processos inflamatórios (KERN; JONES, 2006; MARÍ *et al.*, 2013); disfunções imunes, como resposta imune prejudicada ou alterada e desregulação de citocinas inflamatórias (COHLY; PANJA, 2005; KERN; JONES, 2006); e integridade gastrointestinal reduzida, com aumento da permeabilidade neste tecido (KERN; JONES, 2006; KUSHAK *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2012); e toxicidade (KERN; JONES, 2006).

3.2.2 Marcadores de disfunção mitocondrial

A disfunção mitocondrial é marcada por prejuízos na produção de energia, provavelmente causada por evento precoce de neurodegeneração, sendo muito comum em indivíduos com TEA (GOLDANI *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A disfunção mitocondrial pode ser consequência de muitos fatores, como imunidade reativa e alteração da sinalização de cálcio (Ca^{2+}), aumento de óxido nítrico, desnutrição, deficiência de ferro, metais tóxicos, estresse oxidativo e exposição a tóxicos ambientais, como metais pesados, produtos químicos, pesticidas, entre outros (GOLDANI *et al.*, 2014).

Outras fontes de sofrimento mitocondrial incluem medicamentos como o ácido valproico, que inibe a fosforilação oxidativa e os neurolépticos, classe pertencente aos antipsicóticos (GOLDANI *et al.*, 2014; PALMIERI; PERSICO, 2010).

Os marcadores de disfunção mitocondrial incluem lactato, piruvato, razão lactato/piruvato, carnitina (livre e total), alanina, aminoácidos, ubiquinona, amônia, glicose e creatina quinase (CK) (ROSSIGNOL; FRYE, 2012). Muitos estudos de TEA relataram elevações no lactato e piruvato, alguns a diminuição na carnitina, enquanto

outros relataram níveis anormais de alanina em pacientes com TEA ou elevações na CK sérica (FRYE *et al.*, 2013; 2019).

3.2.3 Marcadores de desregulação imunológica

Citocinas pró-inflamatórias alteradas, proteínas do complemento, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento estão correlacionados com o TEA (GOLDANI *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2020).

O sistema imunológico e as citocinas pró-inflamatórias, especialmente a interleucina 6 (IL-6), podem desempenhar papel importante na patogênese do autismo (PINTO *et al.*, 2021). Yang *et al.* (2015) observaram aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e diminuição nas citocinas anti-inflamatórias e da proteína de ligação C4b. Alzghoul *et al.* (2019) também relataram um aumento de IL-6, IL-8 e TNF- α nesses indivíduos.

A IL-6 é normalmente expressa em baixos níveis no cérebro, no entanto, na presença de lesão ou inflamação cerebral, a IL-6 encontra-se elevada (GADIENT; OTTEN, 1997; WEI *et al.*, 2011). A superexpressão crônica de IL-6 pode causar alterações neuroanatômicas e neurofisiológicas associadas à patogênese de doenças neurológicas, como prejuízo na adesão e migração de células neurais e desequilíbrio das sinapses excitatórias e inibitórias (GRUOL; NELSON, 1997; WEI *et al.*, 2011).

3.2.4 Aminoácidos e neurotransmissores

Outra via de pesquisa avalia a detecção de neurotransmissores e aminoácidos como biomarcadores para o diagnóstico de doenças. Entre eles, destacam-se as pesquisas realizadas sobre os sistemas de glutamato e ácido gama-aminobutírico, GABA (PINTO *et al.*, 2021).

O glutamato é o aminoácido livre mais abundante no cérebro e é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (NAUSHAD *et al.*, 2013; ZHOU; DANBOLT, 2014). Ele participa ativamente de vários processos de desenvolvimento neurológico, junto com o ácido gama-aminobutírico (GABA), que atua como neurotransmissor inibitório (CAI *et al.*, 2016).

Esses processos estão relacionados, principalmente, à memória e à modulação da aprendizagem, atividades nas quais os indivíduos com TEA apresentam deficiências, indicando alterações que tornam relevante a análise desse neurotransmissor (CAI *et al.*, 2016).

Naushad *et al.* (2013), El-Ansary e Al-Ayadhi (2014) e Cai *et al.* (2016) relataram um aumento nos níveis de glutamato em indivíduos com TEA, o que pode induzir hiperexcitabilidade e até citotoxicidade em neurônios pós-sinápticos, estimulando a produção de várias enzimas, como proteína quinase C, proteína quinase dependente de cálcio, fosfolipases, proteases, fosfatases, entre outras, contribuindo para a lesão da membrana celular.

Alguns estudos, também, demonstraram uma disfunção entre os sistemas GABAérgico e glutamatérgico no início do desenvolvimento, levando a grave desequilíbrio excitatório/inibitório nos circuitos neuronais que podem ser responsáveis pelos déficits comportamentais observados em indivíduos com autismo (DHOSSCHE *et al.*, 2002; EL-ANSARY; AL-AYADHI, 2014).

3.2.5 Marcadores hormonais

O cortisol é um hormônio intensamente estudado. Ele está associado ao controle do estresse e processos inflamatórios, além de contribuir para a regulação do sistema imunológico (CAETANO JÚNIOR; CASTILHO; RANIERO, 2017), atuando também no desenvolvimento e funcionamento emocional (RATAJCZAK; SOTHERN, 2015). A diminuição nos níveis de cortisol salivar foi observada nos estudos de Ratajczak e Sothern (2015) e Yang *et al.* (2015), indicando uma disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). No entanto, Bakker-Huvenaars *et al.* (2018) encontraram valores inalterados de cortisol salivar em indivíduos com TEA, demonstrando uma inconsistência do cortisol como biomarcador.

Outro hormônio é a testosterona, que apresentou aumento em sua concentração em indivíduos com TEA (EL-ANSARY; AL-AYADHI, 2014), divergindo de outros estudos que não relataram alteração ou observaram diminuição na concentração plasmática de testosterona (BAKKER-HUVENAARS *et al.*, 2018; CROONENBERGHS *et al.*, 2010). Entretanto, esses resultados conflitantes podem

ser justificados pelos níveis variáveis de testosterona de acordo com a faixa etária e sexo (BAKKER-HUVENAARS *et al.*, 2018; RATAJCZAK; SOTHERN, 2015).

A ocitocina também é um hormônio relevante avaliado em poucos estudos com indivíduos com TEA. Modahl *et al.* (1998) e Bakker-Huvenaars *et al.* (2018) relataram que crianças autistas tinham níveis de ocitocina significativamente mais baixos.

3.2.6 Análises proteômicas

Observou-se aumento expressivo no número de publicações com análise proteômica, principalmente utilizando saliva, a fim de detectar marcadores para diagnóstico precoce de TEA. Ngounou Wetie *et al.* (2015a) relataram aumento de diversas proteínas relacionadas a alteração do sistema imunológico, estresse oxidativo e metabolismo de lipídios e colesterol. Por sua vez, Cortelazzo *et al.* (2016) relataram alterações em 12 proteínas plasmáticas, sendo 10 dessas envolvidas no processo inflamatório agudo, além do aumento da peroxidação lipídica, também observado nos estudos de Al-Gadani *et al.* (2009).

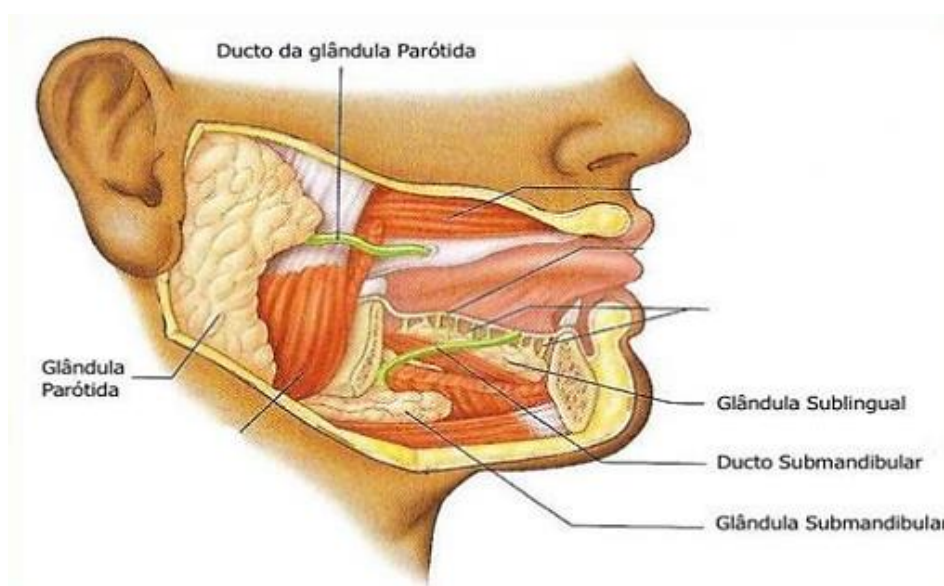
A partir desses dados, é possível afirmar que não há consenso quanto aos resultados obtidos nas pesquisas que buscam biomarcadores para diagnóstico precoce do TEA. O provável motivo é a falta de esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos desse transtorno, associado às divergências entre os achados dos estudos, muitos deles relacionados à concentração dos diversos marcadores avaliados. O cenário ainda é nebuloso e todas as alternativas apresentadas devem ser exaustivamente avaliadas, considerando que o diagnóstico tardio acarreta prejuízos no desenvolvimento desses indivíduos, muitos dos quais irreversíveis.

3.3 Saliva

A saliva é um fluido biológico oral, de aparência clara, constituído pela mistura das secreções de três glândulas salivares maiores – as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais (Figura 1) – e diversas glândulas salivares menores, como as labiais, bucais, linguais, palatinas e glossopalatinas (FAUSTINO, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2017; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

Essa mistura é responsável por 90% de sua composição (MARCHEZAM, 2018), sendo que aproximadamente 60% da secreção de saliva não estimulada é derivada das glândulas submandibulares, 25 % das parótidas, de 7 a 8% das sublinguais e de 5% a 8% de glândulas salivares menores (AFFOO *et al.*, 2015; EDGAR; DAWES; O'MULLANE, 2012; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

Figura 1 - Localização anatômica das três maiores glândulas salivares: parótida, sublingual e submandibular.



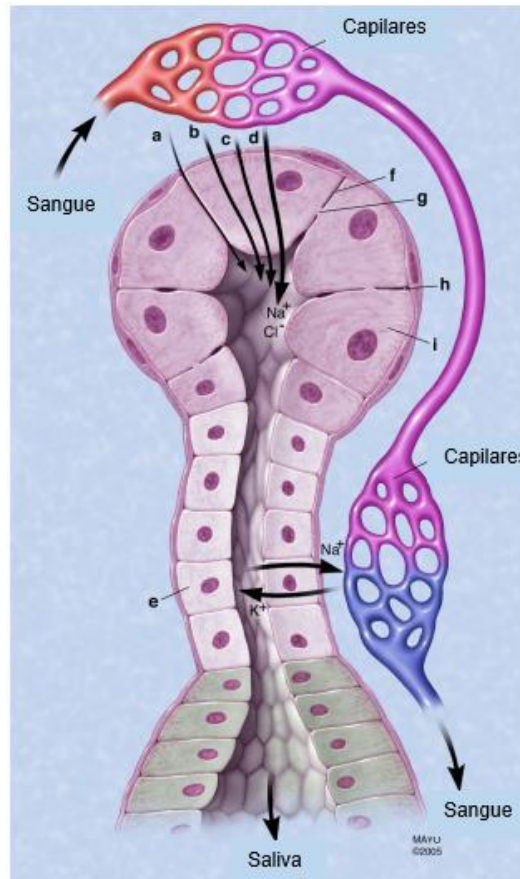
Fonte: Silva (2017a).

As glândulas salivares são formadas por células acinares, ductos e células mioepiteliais, irrigadas por capilares sanguíneos (NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2014; YOSHIZAWA *et al.*, 2013). Entretanto, sua composição é modificada ao passar pelos sistemas de ductos que conectam as células acinares, alterando as concentrações de eletrólitos devido ao transporte iônico (LIMA *et al.*, 2016). Enquanto a saliva passa pelos ductos salivares, Na^+/Cl^- são reabsorvidos e $\text{K}^+/\text{HCO}_3^-$ são excretados por transporte ativo pelos canais iônicos. Devido a relativa impermeabilidade dos ductos para a água, a saliva resultante tem característica hipotônica (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015; LIMA *et al.*, 2016).

Além disso, uma considerável porção das proteínas da saliva deriva da corrente sanguínea, entrando por difusão, filtração ou transporte ativo pelo fluido crevicular gengival (MARCHEZAM, 2018; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

A Figura 2 apresenta os mecanismos de transporte de componentes do plasma para a glândula salivar.

Figura 2 - Mecanismos de transporte de componentes do plasma para a glândula salivar. a) Transporte Ativo. b) Difusão Passiva. c) Filtração Simples. d) Bombardeamento ativo de Na^+ para dentro do ducto pelas células acinares. e) Bombardeamento de Na^+ pelas células ductais de volta para o sangue. f) Membrana celular. g) Poro membranas. h) Espaço intracelular. i) Célula acinar.



Fonte: Adaptado de Yoshizawa *et al.* (2013).

As secreções das glândulas salivares podem ser serosas, mucosas ou mistas. A glândula parótida produz secreção de consistência serosa ou aquosa, rica em íons e em enzimas. As glândulas menores produzem saliva do tipo mucosa, que contém mucinas (glicoproteínas) e apresenta pouca ou nenhuma atividade enzimática. Já as glândulas sublinguais e submandibulares secretam conteúdo misto, contendo saliva dos tipos serosa e mucosa, com aspecto mais viscoso, devido a presença de glicoproteínas (EDGAR; DAWES; O'MULLANE, 2012; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

Essa mistura, ao ser secretada na cavidade oral, se junta ao fluído crevicular gengival, restos alimentares, secreção das vias aéreas superiores, células

sanguíneas, células epiteliais descamadas, bactérias e produtos bacterianos, formando o que é chamado de “saliva total” (FAUSTINO, 2011).

O principal componente da saliva total é a água, que representa cerca de 99% de seu peso. O restante do fluido é formado por compostos orgânicos e inorgânico. A porção inorgânica é a menor e inclui íons como: Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{+2} , Mg^{2+} , F^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- , tiocianato, entre outros (CHIAPPIN *et al.*, 2007; FAUSTINO, 2011; KOHARA, 2016).

Já a porção orgânica da saliva inclui grande número de compostos como: peptídeos e proteínas como glicoproteínas, fosfoproteínas e enzimas; aminoácidos; lipídeos, como colesterol e ácidos graxos; carboidratos, como glicose; ácido láctico; ácido siálico; bilirrubina e creatinina; ácido úrico; vitaminas; e compostos nitrogenados como ureia e amônia (CHIAPPIN *et al.*, 2007; DERRUAU *et al.*, 2020; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; KOHARA, 2016). O principal componente proteico encontrado no fluido salivar é a enzima α -amilase, que representa cerca de 60% do conteúdo proteico total da saliva (ARCHETTI, 2014; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

Outras proteínas e glicoproteínas encontradas na saliva são mucinas; lactoferrina; anticorpos, como as imunoglobulinas, especialmente a Imunoglobulina A (IgA); anidrases carbônicas; albumina; cistatinas; estaterina; lisozimas; proteínas ricas em prolina; e proteínas ricas em tirosina (ALVES; SEVERI, 2016; ARCHETTI, 2014; CAETANO JÚNIOR, 2016). Também são encontrados fatores de crescimento (EGF, NGF, VEGF, IGF); citocinas e quimiocinas (IL-1 beta, IL-8, IL-6, MCP-1, CX3CL1, GRO-1 alfa, troponina I, TNF- α); e ácidos nucleicos (DNA humano, DNA microbiano, mRNA, siRNA, micro RNA) (MALAMUD, 2011).

Alguns hormônios esteroides também estão presentes neste fluido, dentre os principais estão o cortisol, a testosterona, a desidroepiandrosterona (DHEA), a progesterona, o estradiol, o estrogênio e a aldosterona (CHIAPPIN *et al.*, 2007; CAETANO JÚNIOR, 2016; MALAMUD, 2011).

A composição da saliva também depende do fluxo salivar. Esse é definido como a produção de saliva num dado intervalo de tempo (KOHARA, 2016). O fluxo salivar pode variar individualmente, e, ao longo do dia, pode sofrer pequenas alterações. Indivíduos adultos saudáveis normalmente produzem 0,5-1 L de saliva por dia, com taxa aproximada de 0,5 mL/min, sendo a secreção em torno de 0,3 a 0,4 mL/min para saliva não estimulada, e entre menos de 2,0 até mais de 7,0 mL/min para saliva estimulada artificialmente, dependendo do tipo de estimulação utilizada (ALMEIDA *et*

al., 2008a; DAWES *et al.*, 2015; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; KOHARA, 2016; WU *et al.*, 2007). O pH salivar também pode variar de 6 a 7, podendo atingir 5,3, com baixo fluxo e/ou 7,8, no pico do fluxo salivar (CAETANO JÚNIOR, 2016).

Diversos fatores podem alterar a composição e o fluxo salivar, dentre eles estão: o grau de hidratação do corpo, o uso de tabaco, a postura corporal, o uso de medicamentos, o método de coleta (estimulada ou não), fatores hormonais, inflamações e lesões orais, condições sistêmicas, exercício físico, alimentação, dentre outros (ALMEIDA *et al.*, 2008a; DERRUAU *et al.*, 2020; KHAUSTOVA *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2016b). A estimulação da saliva pode ocorrer devido a estímulos dos sentidos (mastigatórios, olfativos, tácteis ou gustativos), substâncias químicas e fatores sazonais e diurnos (DAWES, 2008; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; KOHARA, 2016).

Além disso, o fluxo salivar varia de acordo com o ciclo circadiano, sendo sugerido um aumento da taxa salivar não estimulada no meio da tarde (DAWES, 1972; WU *et al.*, 2007), demonstrando a importância da coleta da saliva no mesmo horário do dia.

A idade, também, pode ser um fator de alteração do fluxo da saliva não estimulada, uma vez que parece aumentar ao longo da infância, variando de 0,22-0,82 mL/min em crianças a 0,33-1,42 mL/min em adultos, com alteração na concentração de proteínas salivares e hormônios em crianças e jovens (KOHARA, 2016; WU *et al.*, 2007).

Outro fator que pode afetar o fluxo salivar é o estresse psicológico, que pode ocorrer em indivíduos que sofrem com insônia, depressão e fadiga. Diversos estudos sugerem que o estresse pode ativar o sistema nervoso simpático e induzir a diminuição do volume de saliva não-estimulada e o aumento nos níveis de cortisol e α -amilase na saliva, sendo a atuação desse último mais rápida (BHATTARAI; KIM; CHAE, 2018; CAETANO JÚNIOR; CASTILHO; RANIERO, 2017; NATER *et al.*, 2005; TAKAI *et al.*, 2004)

A secreção salivar é regulada por um arco reflexo, que consiste em receptores aferentes e nervos carregando impulsos que são induzidos pelas ações de gustação e mastigação, um centro de salivação e uma parte eferente, que consiste nos nervos autônomos parassimpáticos e simpáticos. Portanto, a secreção da saliva, bem como sua composição e funções, é controlada pelos sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático (COHEN; KHALAILA, 2014)

A parte serosa das glândulas é controlada pelo sistema simpático e a parte mucosa, pelos sistemas parassimpático e simpático. Os estímulos α - β adrenérgicos e colinérgicos, tanto neurais quanto farmacológicos, podem modificar a viscosidade e as concentrações iônicas e proteicas (CHIAPPIN *et al.*, 2007)

Dessa forma, a estimulação simpática diminui o volume de saliva e aumenta o seu nível de proteínas e K^+ , como em casos de desidratação e prática de atividade física (CHIAPPIN *et al.*, 2007; NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2014).

Por sua vez, a estimulação parassimpática aumenta o fluxo de saliva pelas glândulas parótidas e submandibulares, diminuindo os níveis de compostos orgânicos, como proteínas, e inorgânicos, alterando a força iônica e até o nível do pH (CHIAPPIN *et al.*, 2007; POLLAND; HIGGINS; ORCHARDSON, 2003; WU *et al.*, 2007). Nesse caso, a diminuição do pH pode ser um responsável precoce da desregulação de biomarcadores salivares de estresse, como cortisol, sIgA e α -amilase (COHEN; KHALAILA, 2014).

Além disso, a presença de alimento na boca também pode afetar a composição salivar, aumentando a liberação de proteínas totais e enzimas como a α -amilase na saliva, além da depuração de compostos do plasma para saliva, como água, íons e hormônios (CHIAPPIN *et al.*, 2007).

Por ser um fluido de composição complexa, a saliva desempenha diversas funções vitais à manutenção da saúde e da homeostase oral (FAUSTINO, 2011). Na cavidade oral, auxilia na lubrificação de tecidos moles e duros, a fim de proteger contra o desgaste dental e irritação mecânica, térmica e química, além de facilitar o fluxo de ar, a fala, a mastigação, a deglutição e a percepção do sabor. Também realiza a manutenção da mineralização dental, limpeza, tem capacidade tampão, regulação do balanço iônico na remineralização do esmalte, ação antimicrobiana e auxilia na digestão de carboidratos e formação do bolo alimentar (ARCHETTI, 2014; CHIAPPIN *et al.*, 2007; EDGAR; DAWES; O'MULLANE, 2012; FAUSTINO, 2011).

O Quadro 1 apresenta as principais funções da saliva e os componentes que atuam em cada processo.

Quadro 1 – Principais funções da saliva e seus componentes.

Área de atuação	Funções	Componentes
Dentes e Cavidade oral	Remineralização	Cálcio, Fosfato, Fluoretos e Proteínas (proteínas ricas em prolina, estaterina)
	Inibição da desmineralização	Proteínas (mucinas)
	Modulação do pH e da capacidade de tamponamento da saliva	Bicarbonatos, Fosfatos e Proteínas (sialina)
	Lubrificação e limpeza; agregação e/ou adesão de micro-organismos; contribuição no metabolismo da biofilme	Proteínas (proteínas ricas em prolina, glicoproteínas e mucinas)
Microorganismos	Anti-bacteriana	Imunoglobulinas, Enzimas (lactoperoxidase), Histatinas, Cistatinas e Proteínas (mucinas, lisozima, lactoferrina, aglutinina, etc)
	Anti-fúngica	Imunoglobulinas, proteínas (mucinas) e Histatinas
	Anti-viral	Imunoglobulinas, proteínas (mucinas) e Cistatinas
Sistema digestivo	Digestão	Enzimas (α -amylase, Lipase, Protease, DNase, RNase)
	Paladar	Zinco
	Bolo alimentar	Proteínas (mucinas)

Mizobe-one, Araújo e Dos-Santos, 2006; Archetti, 2014; Nunes, Mussavira e Bindhu, 2014.
Fonte: elaborado pelo autor.

3.3.1 Potencial diagnóstico da saliva

O uso da saliva como amostra para análises clínicas tem aumentado nas últimas décadas (LOPEZ-JORNET *et al.*, 2020). A saliva, como dito anteriormente, é um fluido corporal que apresenta diversas moléculas biológicas, incluindo DNA, miRNA, enzimas, antioxidantes, hormônios, anticorpos, proteínas, metabólitos, microbiota e outros componentes que refletem a condição fisiológica do corpo (FARINHA, 2015; KAUFMAN; LAMSTER, 2002; LAWRENCE, 2002; LIMA *et al.*, 2010; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

Desse modo, essas moléculas podem ser utilizadas como marcadores biológicos específicos, ou biomarcadores, para diagnóstico de doenças orais e sistêmicas, principalmente em suas fases iniciais (BEL'SKAYA; SARF; KOSENOK, 2020; BHATTARAI; KIM; CHAE, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2017). Além disso, pode ser utilizado para avaliar o prognóstico da doença e controlar a resposta a determinado tratamento (BEL'SKAYA; SARF; SOLOMATIN, 2020).

Diversas doenças podem ser diagnosticadas por meio de alterações na composição bioquímica das secreções salivares, como doenças autoimunes,

diabetes, doenças cardiovasculares, doenças bucais, tumores, entre outros (BHATTARAI; KIM; CHAE, 2018; MARCHEZAM, 2018). Porém, nos últimos anos, vem aumentando também o seu uso para doenças neuropsiquiátricas, como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington (BEL'SKAYA; SARF; SOLOMATIN, 2020; KUŁAK-BEJDA *et al.*, 2019; MARCHEZAM, 2018). Dentre essas condições, destaca-se o potencial da saliva para o diagnóstico de transtorno do espectro autista (KUŁAK-BEJDA *et al.*, 2019).

Em relação ao sangue, a saliva possui muitas vantagens, entre as quais destacam-se:

1) A coleta da saliva é fácil e rápida, permitindo que indivíduos com pouco treinamento possam fazer a coleta, ao contrário da colheita de sangue, que necessita de profissionais treinados e qualificados (BEL'SKAYA; SARF; SOLOMATIN, 2020; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

2) A saliva é coletada por método não-invasivo. Já a colheita de sangue é um procedimento invasivo, que utiliza materiais perfurocortantes, gerando maiores riscos de transmissão de doenças, como o Hepatite e HIV, tanto para o indivíduo quanto para o profissional. Além disso, pode causar dor e maior estresse a indivíduos mais sensíveis, como no caso de pessoas com deficiências, crianças ou idosos, recém-nascidos e indivíduos com TEA (ESSER *et al.*, 2008; NGOUNOU WETIE *et al.*, 2015a; PUTNAM *et al.*, 2012; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

3) O diagnóstico por meio da saliva é mais econômico do que pelo sangue, uma vez que é facilmente coletada, armazenada e transportada (BEL'SKAYA; SARF; SOLOMATIN, 2020; YOSHIZAWA *et al.*, 2013).

4) Questões éticas e culturais podem dificultar a colheita de sangue. Desse modo, a aprovação para coleta da saliva é mais facilmente obtida (FARINHA, 2015).

3.4 Lactoferrina: estrutura e funções

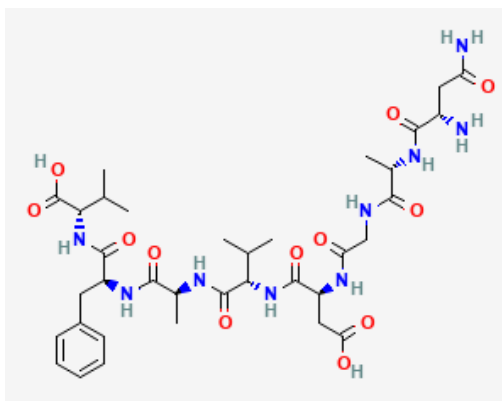
A lactoferrina (LT), também conhecida como lactotransferrina (LCT), é uma glicoproteína da família transferrina, que possui massa molar de 791,8 g/mol, peso molecular de cerca de 80 kDa e fórmula molecular de $C_{35}H_{53}N_9O_{12}$ (Figura 3). Ela é composta por um único polipeptídeo com dois lóbulos globulares localizados nas regiões terminais, denominados de lóbulo C (acetil) e N (amino), conectados por α -hélice (OCHOA; CLEARY, 2009; STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000).

A lactoferrina pode ser encontrada em diferentes fluidos corporais, como lágrimas, leite materno, suor, secreções nasais e na saliva (GLIMVALL; WICKSTRÖM; JANSSON, 2012; PÓLVORA, 2018). Na cavidade oral é secretada pelas células acinares serosas das glândulas salivares maiores e menores (ALMSTÅHL; WIKSTRÖM; GROENINK, 2001; OLSEN; SINGHRAO, 2021). Na saliva total, ela também se origina do fluido crevicular gengival (OLSEN; SINGHRAO, 2021).

A característica mais importante da lactoferrina é a sua capacidade de se ligar a íons de ferro (Fe^{+2} e Fe^{+3}), passando a se chamar holo-lactoferrina (QUEIROZ; ASSIS; DA COSTA, 2013), sendo responsável pelo transporte e metabolismo desse mineral pelas células do organismo. Entretanto, ela também apresenta afinidade menor por outros íons, como Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , entre outros (VAN DER STRATE *et al.*, 2001).

Estudos avaliaram a concentração normal de lactoferrina salivar \pm Desvio Padrão (DP) em $8,4 \pm 10,3$ mg/L, para saliva não estimulada, e $5,5 \pm 4,76$ mg/L, para saliva estimulada (EDGAR; DAWES; O'MULLANE, 2012).

Figura 3– Estrutura química da Lactoferrina.



Fonte: Lactoferrin (Human). Pub Chem Compound (2021).

A lactoferrina humana apresenta grande potencial para prevenir morbidades, especialmente as gastrintestinais, pois desempenha diversas funções fisiológicas como, proteção do trato gastrintestinal; capacidade de estimular a proliferação celular; ação anti-inflamatória, associada à sua capacidade de penetrar no núcleo do leucócito e bloquear a transcrição do fator nuclear Kappa B; e manutenção do sistema imunológico (QUEIROZ; ASSIS; DA COSTA, 2013; STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000).

Outra função de extrema importância é a sua ação antimicrobiana (bacteriostática, bactericida, fungicida e antiviral), que está relacionada à sua capacidade de sequestrar ferro dos fluidos biológicos, essenciais para o crescimento de alguns microrganismos, e/ou de desestruturar a membrana desses seres (QUEIROZ; ASSIS; DA COSTA, 2013). Essa ação atua, também, na proteção da mucosa intestinal, uma vez que ela impede o acesso de bactérias à parede do intestino (OCHOA; CLEARY, 2009)

Em situações de infecção e inflamação, a atividade metabólica das bactérias diminui o pH. A lactoferrina, nesse caso, é importante pois se mantém ligada ao ferro mesmo nessa condição, impedindo a utilização do ferro para proliferação bacteriana (OCHOA; CLEARY, 2009; STEIJNS; VAN HOOIJDONK, 2000). Dessa forma, ela pode ser considerada um bom marcador de inflamação intestinal.

Além disso, a lactoferrina é um componente da homeostase imunológica e auxilia o combate ao estresse, devido à sua atividade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo que pode ser causado pelo ferro no organismo, controlando respostas inflamatórias em excesso e evitando dano celular. Sua propriedade antioxidante é também uma grande aliada para o sistema imunológico (QUEIROZ; ASSIS; DA COSTA, 2013).

3.4.1 Lactoferrina como biomarcador de Transtorno do Espectro do Autista

Indivíduos com TEA frequentemente sofrem de problemas gastrintestinais, como inflamação intestinal e aumento da permeabilidade intestinal (DE MAGISTRIS *et al.*, 2010; KUSHAK *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2012). Em dados do programa de autismo do Hospital Infantil de Cincinnati, 24% das crianças com TEA tinham história de pelo menos 1 sintoma gastrintestinal (MOLLOY; MANNING, 2003).

Além de causarem desconforto e dores, problemas comuns, como refluxo gastroesofágico, prisão de ventre ou diarreia, podem influenciar em um aumento de comportamentos estereotipados, agressivos ou autolesivos nessa população (KUSHAK *et al.*, 2016).

Nesse sentido, a lactoferrina pode ser utilizada como um biomarcador para identificar indivíduos com TEA (KUSHAK *et al.*, 2016). A hipótese é que esses indivíduos possuem níveis menores de lactoferrina, levando a inflamações mais intensas, tanto orais quanto gastrointestinais e sistêmicas. Esse processo inflamatório, ao se tornar constante, pode causar lesões cerebrais, induzindo sintomas do TEA.

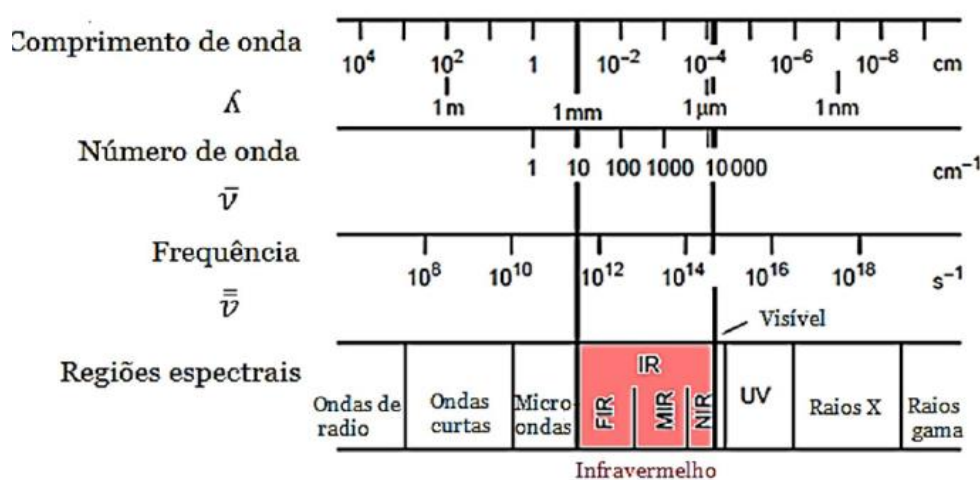
3.5 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

A região do infravermelho está localizada entre as regiões do visíveis e micro-ondas, que corresponde aos comprimentos de onda (λ) de 0,8 μm a 1000 μm , sendo expressa usualmente em números de onda de 12.800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} (BENETTI, 2014; HAACK, 2010).

Essa região é, ainda, dividida em infravermelho próximo (NIR), de 13.000 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} , médio (MIR), de 4.000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , e distante (FAR), de 400 cm^{-1} a 100 cm^{-1} (BANHARA, 2016; PASQUINI, 2003; STUART, 2004).

A Figura 4 apresenta o espectro eletromagnético, dando ênfase nas regiões no infravermelho.

Figura 4 – Espectro eletromagnético e regiões no infravermelho próximo (NIR), médio (MIR) e distante (FAR).



Fonte: Aguiar (2016).

A região de infravermelho médio, entre 4000 e 400 cm^{-1} é a porção de maior interesse para a análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), pois apresenta bandas com informações referentes a grupos funcionais de estruturas orgânicas, sendo possível entender ou denominar esse composto (AGUIAR, 2016; BENETTI, 2014; HAACK, 2010; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2000; STUART, 2004).

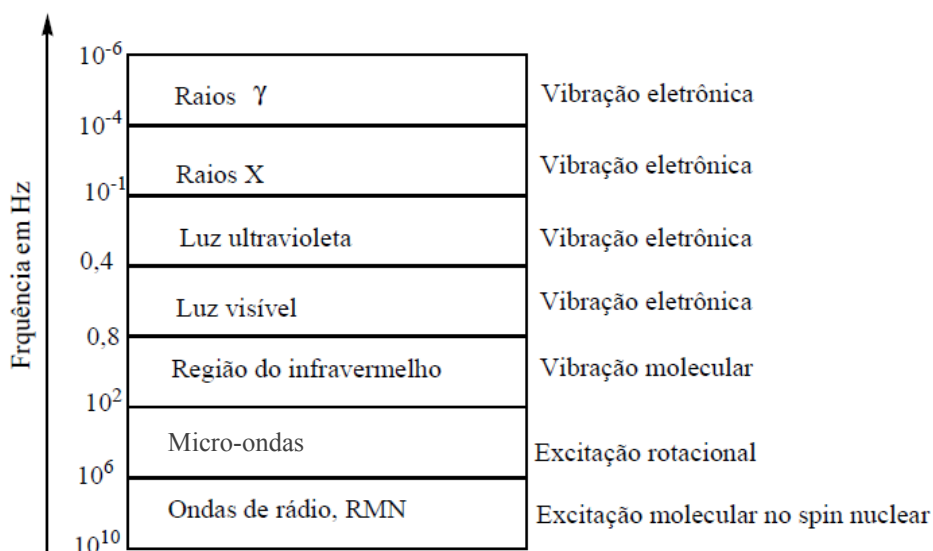
Algumas vantagens desta técnica podem ser destacadas como a facilidade de preparação de amostra, ensaios não destrutivos, reprodutíveis, rápida aquisição de dados, alta sensibilidade e especificidade, para além de não utilizar grande quantidade de amostra e nem reagentes químicos (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015; OLIVEIRA, 2014). A sensibilidade é definida como a probabilidade de o teste apresentar um resultado positivo, enquanto a especificidade é a probabilidade do teste em fornecer um resultado negativo (FERREIRA *et al.*, 2020; MIURA, 2017).

Outro ponto importante desta técnica é a sua capacidade de análise qualitativa e/ou quantitativa, sendo possível analisar amostras orgânicas e inorgânicas praticamente em qualquer estado físico da matéria e/ou em uma mistura desconhecida, levando em consideração os acessórios que podem estar disponíveis no mercado (AHMED *et al.*, 2010; FORATO *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que a interação da radiação eletromagnética com uma molécula tem a probabilidade de gerar várias excitações. Como cada tipo de excitação requer uma quantidade específica de energia, sua absorção ocorrerá em regiões diferentes do espectro eletromagnético (CUNHA *et al.*, 2014; MARIN, 2013).

As excitações eletrônicas normalmente estão localizadas na região do ultravioleta ou visível (BANHARA, 2016). Na região infravermelha, a radiação de baixa energia não é ionizante, ocorrendo as excitações vibracionais, que permite transições entre os níveis de energia vibracionais, resultando no estiramento/deformação das ligações químicas (AGUIAR, 2016; BENETTI, 2014; CUNHA *et al.*, 2014; MARIN, 2013). Enquanto que as excitações rotacionais estão situadas na região das micro-ondas (AGUIAR, 2016; BRUICE, 2006), conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5– Espectro eletromagnético e a excitação molecular.



Fonte: Adaptado de Bruice (2006).

Portanto, a Espectroscopia FT-IR se baseia nos registros das alterações de absorção de radiação infravermelha (IR) após a interação com a amostra, medindo essas variações e as correlacionando com alterações na estrutura molecular da substância em particular (CUNHA *et al.*, 2014; MARIN, 2013).

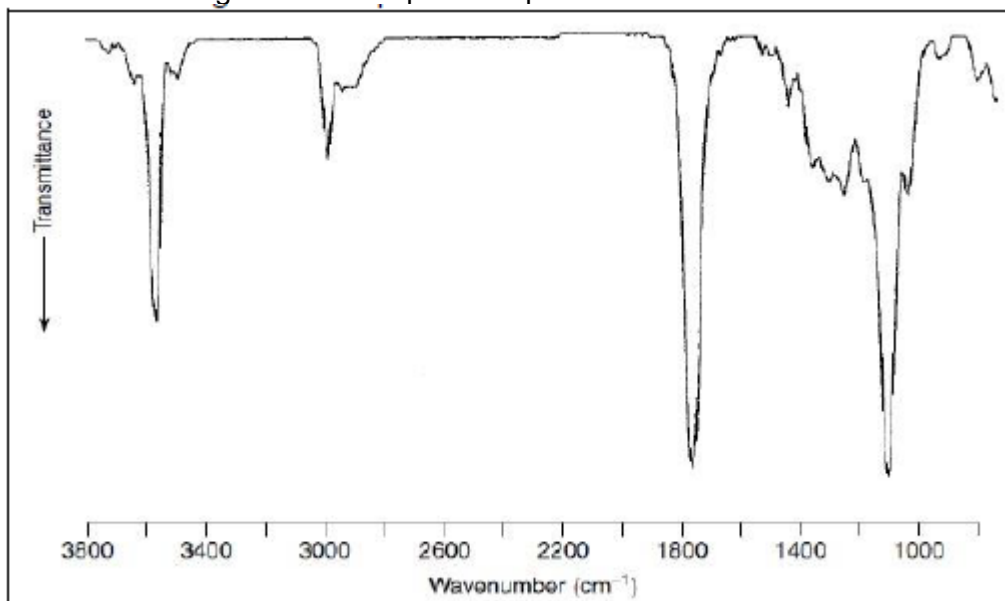
Estas informações são provenientes dos níveis de energia vibracional destas moléculas que interagem com a radiação infravermelha, sendo um processo quantizado (BANHARA, 2016; HAACK, 2010; MARIN, 2013; SILVA, 2011; STUART, 2004). Um espectro é a representação gráfica destas informações, sendo uma função da frequência, energia ou comprimento de onda da radiação (AGUIAR, 2016; BANHARA, 2016; JENKINS; WHITE, 2001).

Apesar do processo de absorção no infravermelho ser quantizado, o espectro vibracional costuma apresentar os resultados em forma de bandas e não em linhas, pois a cada mudança de nível de energia vibracional, uma série de mudanças de níveis rotacionais são correspondentes (BRUICE, 2006; HAACK, 2010; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2000).

As bandas nos espectros no infravermelho podem ser visualizados por meio do eixo vertical e a posição das bandas, no eixo horizontal (BANHARA, 2016). Essas posições podem ser descritas em comprimento de onda (μm) ou número de ondas (cm^{-1}).

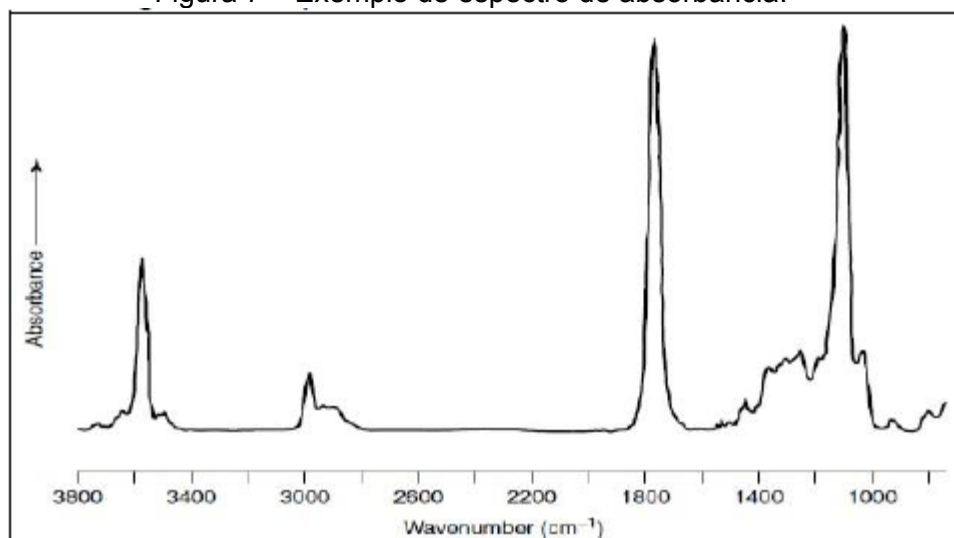
A intensidade das bandas pode ser apresentada em porcentagem de transmitância (%T) ou absorvância (A), conforme apresentado nas Figuras 6 e 7, respectivamente. A transmitância é a razão entre a energia de radiação transmitida através da amostra e a energia de radiação incidente sobre ela. A absorvância é o logaritmo decimal do inverso da transmitância (HAACK, 2010; STUART, 2004).

Figura 6 – Exemplo de espectro de transmitância.



Fonte: Stuart (2004).

Figura 7 – Exemplo de espectro de absorvância.



Fonte: Stuart (2004).

A interpretação dos espectros no infravermelho é feita por meio conformação dos espectros e presença de bandas características principais de grupos funcionais conhecidos (HAACK, 2010). Ao correlacionar essas informações, é possível identificar as estruturas químicas da molécula, como a geometria e as ligações químicas entre seus átomos e, assim, caracterizar a amostra em estudo (AGUIAR, 2016; BANHARA, 2016; HAACK, 2010; SANTOS, 2011).

Por exemplo, a região de 3000 a 2800 cm^{-1} corresponde ao estiramento dos grupos CH_3 e CH_2 de ácidos graxos. A região 1750 a 1500 cm^{-1} corresponde a $\text{C}=\text{O}$, $\text{N}-\text{H}$ e $\text{C}-\text{N}$ de proteínas e peptídeos (Amida I e II) (HAACK, 2010; CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015).

Enquanto que a região de 1500 a 900 cm^{-1} corresponde ao estiramento das ligações $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{C}$ e $\text{C}=\text{O}$ de COO^- e à deformações angulares de $\text{C}-\text{O}-\text{H}$, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ e dos grupos CH_3 e CH_2 de ácidos graxos, características de hormônios e proteínas (ELLIS; GOODACRE, 2006; KHAUSTOVA *et al.*, 2010).

Outro ponto a ser destacado é que os modos vibracionais de um mesmo radical molecular absorvem radiação em certas regiões do espectro, apresentando bandas características em certos números de ondas, independentemente da estrutura da molécula (OLIVEIRA, 2014; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2000). Além disso, a intensidade e forma da banda é de grande importância (SANTOS, 2011), estando diretamente relacionada com a concentração do composto. Por exemplo, os grupos funcionais com momento de dipolo intenso geralmente apresentam absorções intensas no infravermelho (HAACK, 2010; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2000).

Em tecidos biológicos, é comum ocorrer a sobreposição dos modos normais de vibração de diferentes moléculas, produzindo um alargamento de bandas que dificulta a sua identificação (SANTOS, 2011). Essa característica do espectro infravermelho de sistemas biológicos é resultante da contribuição das bandas de absorção no infravermelho de todas as moléculas que o constituem, com moléculas como proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos, entre outros. Dessa forma, métodos matemáticos e estatísticos são muito utilizados para se obter algumas informações estruturais muito complexas nesse sistema (CUNHA *et al.*, 2014; CAETANO JÚNIOR, 2016; SANTOS, 2011).

Dentre esses métodos, destaca-se a derivada espectral, uma análise amplamente utilizada para melhorar a visualização das bandas de absorção,

facilitando a diferenciação entre espectros de diferentes amostras e a permitindo maior precisão dos resultados para identificação das bandas que servem de parâmetros para a deconvolução de bandas (FERREIRA *et al.*, 2020; CAETANO JÚNIOR, 2016; KHAUSTOVA *et al.*, 2010),

3.5.1 Vibrações moleculares e modos vibracionais

A absorção na região do infravermelho é causada por movimentos rotacionais e vibracionais dos átomos de uma molécula e de suas ligações químicas, também chamados de vibrações moleculares (CUNHA *et al.*, 2014; HAACK, 2010; LOPES; FASCIO, 2004).

Uma molécula com N átomos possui um total de $3N$ graus de liberdade, envolvendo movimentos relativos entre os átomos, sem alteração de seu centro de massa (HAACK, 2010; MARIN, 2013).

Em uma molécula não linear, 3 destes graus se referem a movimentos rotacionais em torno de um referencial com a origem no centro de massa da molécula, outros 3 graus se referem a movimentos de translação da molécula inteira e o restante correspondem a vibrações dos átomos que constituem a molécula, o que se traduz em $3n-6$ modos vibracionais (CUNHA *et al.*, 2014; MARIN, 2013; SALA, 1996; SANTOS, 2011).

Enquanto que em uma molécula linear, 2 graus são rotacionais e 3 são translacionais, correspondendo a $3n-5$ modos vibracionais (MARIN, 2013; SALA, 1996; SANTOS, 2011).

As moléculas estão em constante movimento e possuem uma frequência normal de vibração, que correspondem aos níveis de energia da molécula, também chamados de modos normais de vibração (BENETTI, 2014; HAACK, 2010; MARIN, 2013). Essas frequências dependem da geometria molecular, das constantes de força das ligações e das massas relativas dos átomos (CUNHA *et al.*, 2014; HAACK, 2010).

Os movimentos de vibração e rotação dos átomos da molécula podem causar variação na distribuição de cargas moleculares, chamado de momento dipolo, criando um campo elétrico local (BENETTI, 2014; SILVA, 2011; STUART, 2004).

Para que uma determinada molécula apresente absorção na região do infravermelho, as frequências da radiação infravermelha absorvidas devem ter as

mesmas frequências dos modos normais de vibração da molécula (BENETTI, 2014; FORATO *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2014; STUART, 2004).

Quando isso ocorre, as moléculas são excitadas de estados de energia vibracionais menores (E_0) a estados de energia vibracionais maiores (E_1), provocando aumento da amplitude das vibrações dos átomos ao redor das ligações covalentes que os ligam, resultando no estiramento e/ou deformação dessas ligações (BRUICE, 2006; MARIN, 2013; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2000; STUART, 2004).

As vibrações moleculares podem ser de dois tipos: deformações axiais ou estiramentos, representado pela letra grega ν , e deformações angulares, representado pela letra grega δ (BRUICE, 2006; FORATO *et al.*, 2010).

Os estiramentos são as alterações da distância internuclear dos átomos onde esses permanecem no mesmo eixo da ligação, ou seja, apenas há aumento e diminuição dessa distância, alternadamente (FORATO *et al.*, 2010; HAACK, 2010).

Por sua vez, as deformações angulares ou “bending” consistem em mudança na posição dos átomos em relação ao seu eixo de ligação original, alterando os seus ângulos de ligação sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem (BRUICE, 2006; FORATO *et al.*, 2010; HAACK, 2010; MARIN, 2013).

O estiramento pode ser classificado em (OLIVEIRA, 2014):

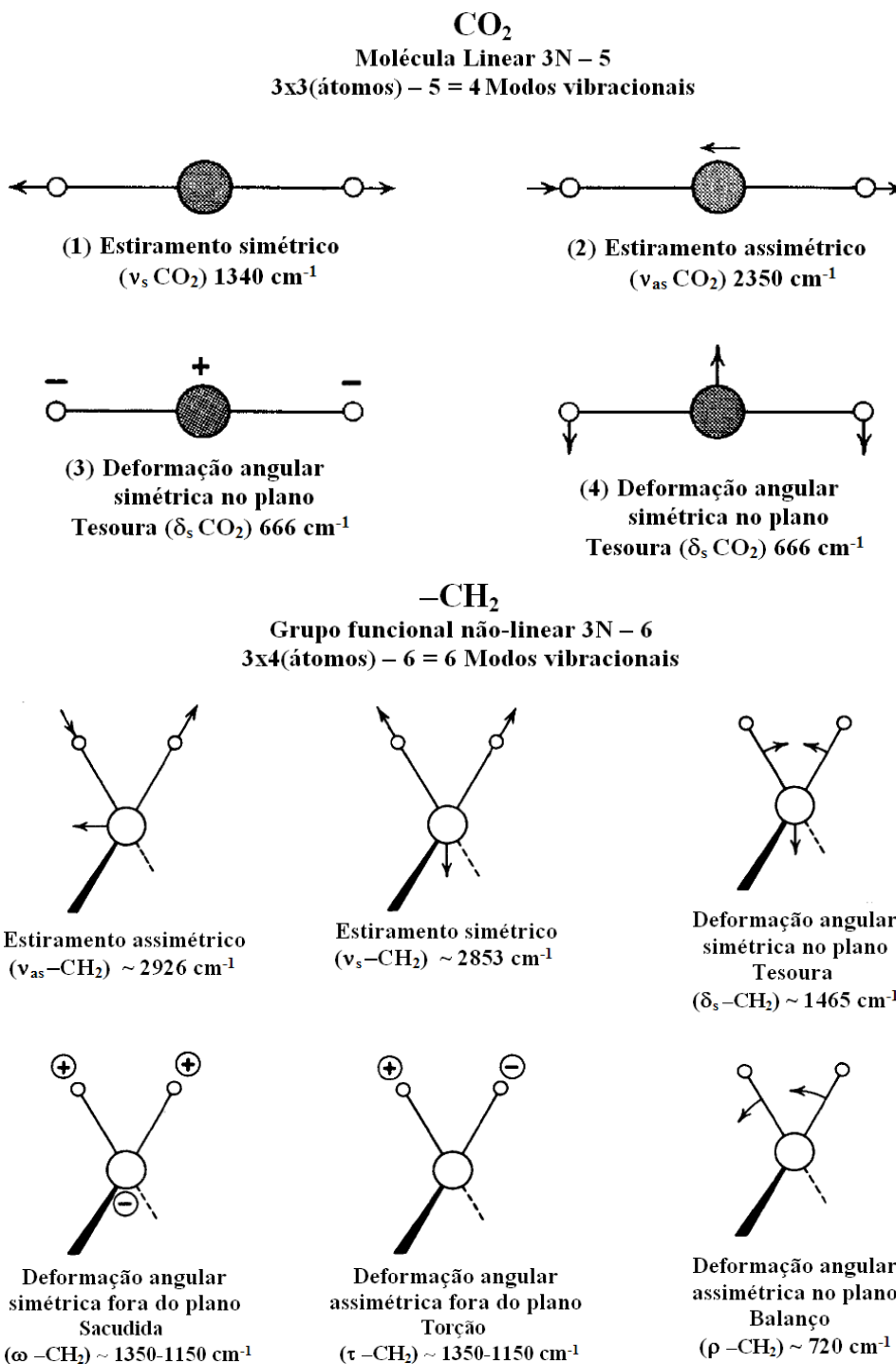
1. Simétrico (s): quando as duas ligações apresentam sempre o mesmo tamanho;
2. Assimétrica (as): quando uma ligação se encurta a outra se alonga.

Já a deformação angular pode ser (HAACK, 2010; SANTOS, 2011):

1. Simétrica no plano, também chamada de tesoura, “scissor” ou dobramento angular;
2. Simétrica fora do plano, também chamada de sacudida ou “wagging”;
3. Assimétrica no plano, também chamada de balanço ou “rocking”;
4. Assimétrica fora do plano, também chamada de torção ou “twist”.

A Figura 8 apresenta exemplos desses modos de vibração para uma molécula linear e uma molécula não linear.

Figura 8 - Modos vibracionais para a molécula de CO₂ (acima) e para o grupo funcional –CH₂ (abaixo). Os sinais + e - indicam os movimentos perpendiculares ao plano da página.



Fonte: Haack (2010).

3.5.2 Análise da saliva por espectroscopia no infravermelho

A análise de tecidos e fluídos biológicos, em especial a saliva, por espectroscopia no infravermelho demonstraram que a técnica é bastante promissora para diagnóstico de diversas doenças orais e sistêmicas (KHAUSTOVA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2017), como câncer, diabetes, doenças virais, autoimunes, renais, entre outras (BEL'SKAYA; SARF, 2021; CARVALHO *et al.*, 2018; DERRUAU *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2020; RENDA, 2017; SANCHEZ-BRITO *et al.*, 2021; SÁNCHEZ-BRITO *et al.*, 2021; SEREDIN *et al.*, 2018). Isso se deve a sua capacidade de detectar alterações de composição química e estrutural induzidas por essas doenças (RIZZATO, 2019).

Apesar do espectro da saliva humana ser considerado bastante complexo, devido à sua composição diversa (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015; SCHULTZ *et al.*, 1996), pesquisas demonstraram que alguns componentes bioquímicos da saliva possuem bandas específicas na região infravermelha ($4000 - 700 \text{ cm}^{-1}$), permitindo que uma região específica do espectro seja atribuída de forma confiável a um grupo macromolecular (KHAUSTOVA *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-BRITO *et al.*, 2021; SEREDIN *et al.*, 2018).

Considerando que a saliva é composta por aproximadamente 99% de água, a principal desvantagem dessa técnica para análise dessa amostra é a sua intensa absorção de água. Entretanto, esse problema pode ser facilmente solucionado pela desidratação da amostra (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015; SÁNCHEZ-BRITO *et al.*, 2021).

Bel'Skaya e Sarf (2021) demonstraram que além de comparar os espectros obtidos para diferentes grupos de pacientes, analisando suas diferenças, também é importante compreender os mecanismos das mudanças que estão ocorrendo. Para isso, é necessário correlacionar bandas individuais nos espectros de FTIR e a composição bioquímica da amostra.

Dessa forma, é possível entender quais mudanças metabólicas sistêmicas podem alterar a aparência do espectro, como intensidade e área da banda de absorção, ajudando a interpretar corretamente o resultados (BEL'SKAYA; SARF, 2021). O resultado obtido, então, pode ser confirmado por dados sobre mudanças na composição bioquímica da saliva nos grupos estudados (BEL'SKAYA; SARF; SOLOMATIN, 2020).

Khaustova *et al.* (2009) mostraram que a técnica de FT-IR com refletância total atenuada (ATR) possui alta precisão e reprodutibilidade na obtenção de espectros de absorção, utilizando apenas 10 µl de saliva.

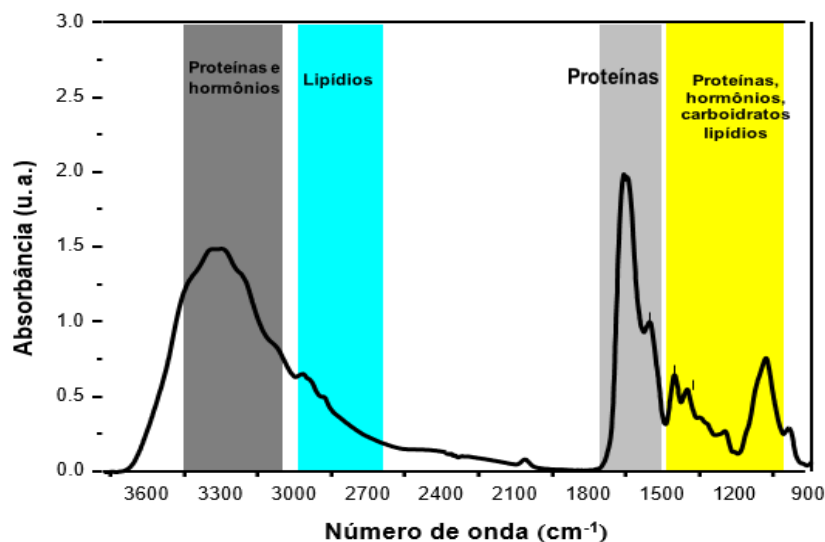
Esse estudo permitiu gerar índices de valores fisiológicos para cortisol, fosfato, glicose, proteína total, slgA e uréia, sendo esses valores correlacionados com os valores de análise clínica de rotina, além de correlacionar essas concentrações com regiões espectrais específicas (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015; KHAUSTOVA *et al.*, 2010; 2009).

O estudo de Bel'Skaya, Sarf e Sollomatin (2020) comparou características dos espectros infravermelhos da saliva de voluntários saudáveis em relação a sexo e idade. Os resultados mostraram diferenças nas bandas de absorção de proteínas e ácidos nucleicos e de lipídios. No grupo de homens, o teor de proteína é maior do que no grupo de mulheres, porém essas apresentaram teor de lipídios mais elevado comparado ao dos homens.

Além da concentração, também ocorrem alterações na estrutura das proteínas e lipídios. Um dos fatores apresentados pelos autores são os processos de peroxidação lipídica, mais pronunciados no grupo masculino. Já em relação a idade, não foram encontradas correlação com as características dos espectros (BEL'SKAYA; SARF; SOLOMATIN, 2020).

A Figura 9 apresenta um exemplo de espectro no infravermelho da saliva, com suas principais bandas de absorção e caracterizações aproximadas dos componentes salivares.

Figura 9 – Espectros médios FT-IR de saliva, registrados a 4000 – 900 cm^{-1} , com suas principais bandas de absorção e caracterizações aproximadas de componentes salivares.



Fonte: adaptado de Caetano Júnior (2016).

Conforme relatado anteriormente, algumas regiões no infravermelho são atribuídas a determinadas moléculas salivares. Dessa forma, no Quadro 2 são descritos os principais modos vibracionais e atribuições aproximadas dos principais componentes da saliva humana na região infravermelha, em função de sua composição química.

Quadro 2 - Modos vibracionais e atribuições dos componentes salivares na região infravermelha.

Número de onda (cm ⁻¹)	Modos vibracionais	Moléculas salivares
4000 cm ⁻¹ a 3000 cm ⁻¹	- Estiramento O-H do grupo hidroxila; - Estiramento N-H de amida A de proteínas.	- Proteínas salivares (α-amilase, albumina, cistatinas, histatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina e SIgA); - Hormônios (cortisol).
3000 cm ⁻¹ a 2800 cm ⁻¹	- Estiramento dos grupos CH ₃ de ácidos graxos.	- Lipídeos (Colesterol e mono/diglicerídeos de ácidos graxos).
1750 cm ⁻¹ a 1620 cm ⁻¹	- Estiramento C=O; - Amidas I e II de proteínas; - Amida I de estruturas α-hélice e de folhas β-pregueadas;	- Proteínas salivares.
1600 cm ⁻¹ a 1500 cm ⁻¹	- Deformação angular N-H de amida II e α-hélice de proteínas e aminoácidos.	
1490 cm ⁻¹ a 1300 cm ⁻¹	- Deformação angular CH ₃ e CH ₂ dos ácidos graxos; - Estiramento simétrico C=O e COO ⁻ ; - Amida III de proteínas; - Estiramento assimétrico P=O de compostos com grupo fosfato.	- Ácidos graxos; - Lipídios; - Proteínas salivares; - Hormônios.
1100 cm ⁻¹ a 1000 cm ⁻¹	- Estiramento C-O e C-C; - Deformações angulares de C-O-H e C-O-C de carboidratos; - Estiramento simétrico P=O do grupo fosfato.	- Polissacarídeos; - Glicose; - Proteínas glicosiladas; - Hormônios.

Para atribuições dos modos vibracionais foram usadas as seguintes referências: Berthomieu e Hienerwadel, 2009; Khaustova, 2010; Caetano Júnior, Strixino e Raniero, 2015.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5.3 Instrumentação

Os espectrofotômetros com Transformada de Fourier (FT-IR) são, atualmente, os equipamentos mais utilizados para análises por espectroscopia no Infravermelho (BENETTI, 2014). O FT-IR é um instrumento não dispersivo que apresenta diversas vantagens em relação aos modelos antigos, como redução do tempo para obtenção dos dados e melhora significativa em sua qualidade, com menor relação sinal-ruído e conversão do sinal analógico para digital, facilitando as análises e a manipulação dos dados (BANHARA, 2016; HAACK, 2010; SANTOS, 2011; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2000).

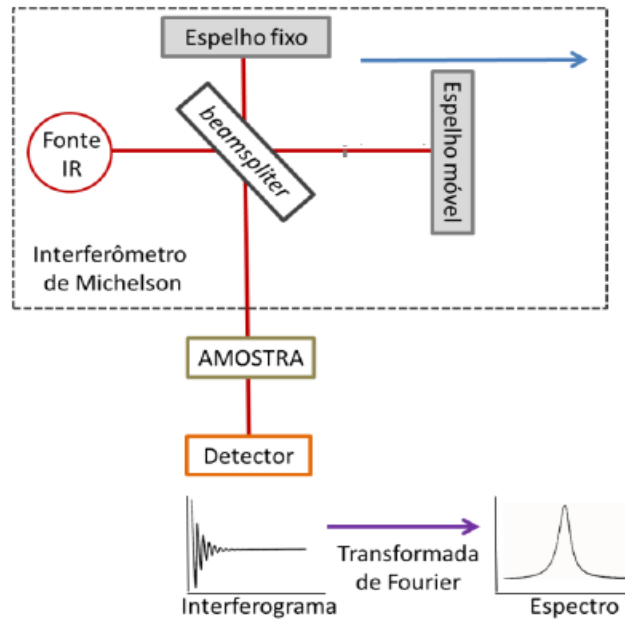
O espectrofotômetro FT-IR é composto por um interferômetro, uma fonte de radiação, uma porta amostra, um detector, um amplificador, um conversor de analógico para digital e um computador. O seu modo de funcionamento consiste no método interferométrico, que utiliza o interferômetro de Michelson (AGUIAR, 2016; OLIVEIRA, 2014; SANTOS, 2011; STUART, 2004).

Para a obtenção de um espectro no infravermelho utilizando o método interferométrico, é necessário primeiramente fazer o background, para a obtenção do interferograma sem a amostra. Logo em seguida, deve-se colocar a amostra entre o interferômetro e o detector (BANHARA, 2016; OLIVEIRA, 2014).

O interferômetro tem a função de dividir o feixe da radiação infravermelha incidente, por meio do uso de espelhos. Uma parte do feixe é refletida por um espelho fixo e a outra parte é refletida por um espelho móvel. Os feixes refletidos voltam a se combinar e passam através da amostra para o detector, gerando um gráfico de tempo do deslocamento do espelho móvel contra da intensidade do sinal, chamado de interferograma. Com a utilização da transformada de Fourier, o interferograma é convertido do em um gráfico que representa a quantidade de radiação detectada em função da frequência da radiação, chamado de espectro (BANHARA, 2016; BENETTI, 2014; BRUICE, 2006; SANTOS, 2011).

A Figura 10 ilustra o funcionamento dos espectrofotômetros com transformada de Fourier.

Figura 10 – Esquema de funcionamento de um espectrofotômetro FTIR.



Fonte: Adaptado de Benetti (2014).

4 METODOLOGIA

Este estudo possui natureza clínica, quantitativa e experimental, tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba, Brasil (CEP/UNIVAP- Parecer nº 1.749.222/2016 - Anexo A). Todos os pais e/ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apresentado no Apêndice A, e os indivíduos avaliados assinaram o Termo de Assentimento, apresentado no Apêndice B, desenvolvido em linguagem adequada a esse público e aplicado individualmente, tanto para neurotípicos quanto para indivíduos com TEA, declarando a participação voluntária no estudo.

O presente trabalho foi composto por duas análises. A primeira consistiu na análise da saliva por teste imunoenzimático específico para detecção de lactoferrina humana e a segunda, pela análise dessa amostra por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).

Os participantes e seus responsáveis foram, primeiramente, entrevistados, com base no questionário individual (Apêndice C e D), seguido de avaliação de lesões intrabuciais e, por fim, foi realizada a coleta da saliva.

Os protocolos detalhados de cada teste e coleta realizada no estudo serão mostrados nas seções posteriores.

4.1 Critérios de inclusão

Os critérios para inclusão dos participantes adotados neste estudo foram:

- idade compreendida entre 3 e 15 anos;
- ambos os sexos;
- diagnóstico prévio de TEA (grupo de estudo) ou neurotípicos (grupo controle);
- ausência de lesões intrabuciais;
- pais e/ou responsáveis com ciência e concordância do objetivo da pesquisa, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- participantes com ciência do objetivo deste estudo e que assinaram o Termo de Assentimento.

4.2 Critérios de exclusão

Os critérios para exclusão dos participantes adotados neste estudo foram:

- fora da faixa etária proposta;
- com presença de alterações observadas clinicamente nos tecidos bucais;
- que não colaboraram ou não realizaram a coleta adequadamente;
- que desistiram por questões pessoais.

4.3 Coleta de dados

Primeiramente, foi realizado o contato inicial com a Clínica Integratta, para coleta de amostras de indivíduos neurotípicos, e com o Grupo de Apoio ao Indivíduo com Autismo (GAIA), para coleta de amostra de indivíduos com TEA, ambos situados em São José dos Campos/SP.

Após estabelecer a parceria, foi feito o contato inicial direto e individual com as crianças e seus pais e/ou responsáveis no próprio ambiente das instituições, nos horários de seu atendimento, para leitura e explicação do estudo e seus objetivos por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do Termo de Assentimento.

Após avaliação dos participantes em relação aos critérios de inclusão e exclusão e da autorização dos indivíduos, por meio da assinatura de ambos os documentos, os voluntários foram orientados a não ingerir alimentos e líquidos (exceto água), absterem-se de alimentos e produtos com cafeína e a não escovar os dentes por pelo menos 2 horas antes do procedimento (CHIAPPIN *et al.*, 2007). Foram coletadas as amostras de saliva de 38 indivíduos, sendo 19 com diagnóstico de TEA (Grupo A) e 19 neurotípicos (Grupo N).

Além disso, foram elaborados pela autora dois questionários, um para os pais e/ou responsáveis pelos indivíduos com TEA (Apêndice C) e outro para os de neurotípicos (Apêndice D), afim de obter algumas informações individuais e médicas do participante e de sua mãe, inclusive o período de gestação e parto, que podem estar relacionadas a etiologia do TEA.

4.4 Coleta salivar

As coletas das 38 amostras foram realizadas na Clínica Integratta e no grupo GAIA, entre 14 e 17 horas, com todos os participantes seguindo as orientações prévias de higiene e alimentação.

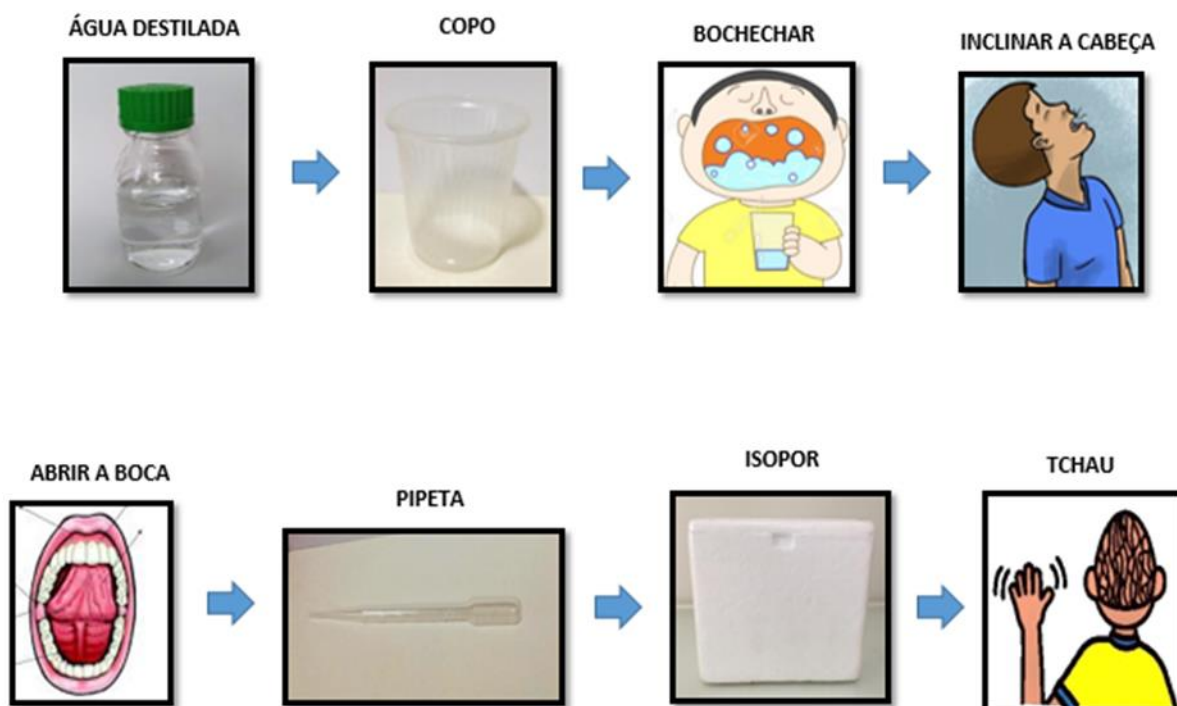
Inicialmente, foi explicado aos participantes e seus pais e/ou responsáveis o processo de coleta. Para os indivíduos com TEA, foi desenvolvido, junto ao grupo GAIA, um passo a passo da coleta por meio de figuras (Fluxograma 1), para o melhor entendimento do processo por esse grupo.

A antissepsia bucal incluiu 10 bochechos com água destilada, desprezando a água após a limpeza. Em seguida, todos os indivíduos permaneceram sentados, com a cabeça ligeiramente inclinada para trás e olhos abertos, evitando fazer movimentos orofaciais (Fluxograma 2A).

A saliva não estimulada foi coletada pelo método de “cuspe” em tubo estéril de 1,5 mL (Fluxograma 2B), sendo esse imediatamente identificado e refrigerado a 5 °C. O biofluido coletado foi submetido à centrifugação de 5000 rpm, por 10 minutos, no equipamento CF 16RN-Hitachi (Fluxograma 2C), para remoção de possíveis resíduos alimentares. Em sequência, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo estéril de 1,5 mL e congelado a -20 °C e o precipitado foi descartado (Fluxograma 2D).

Fluxograma 1– Passo a passo do processo de coleta salivar desenvolvido para indivíduos com TEA.

PASSO A PASSO DA COLETA DE SALIVA:



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Análise da saliva por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

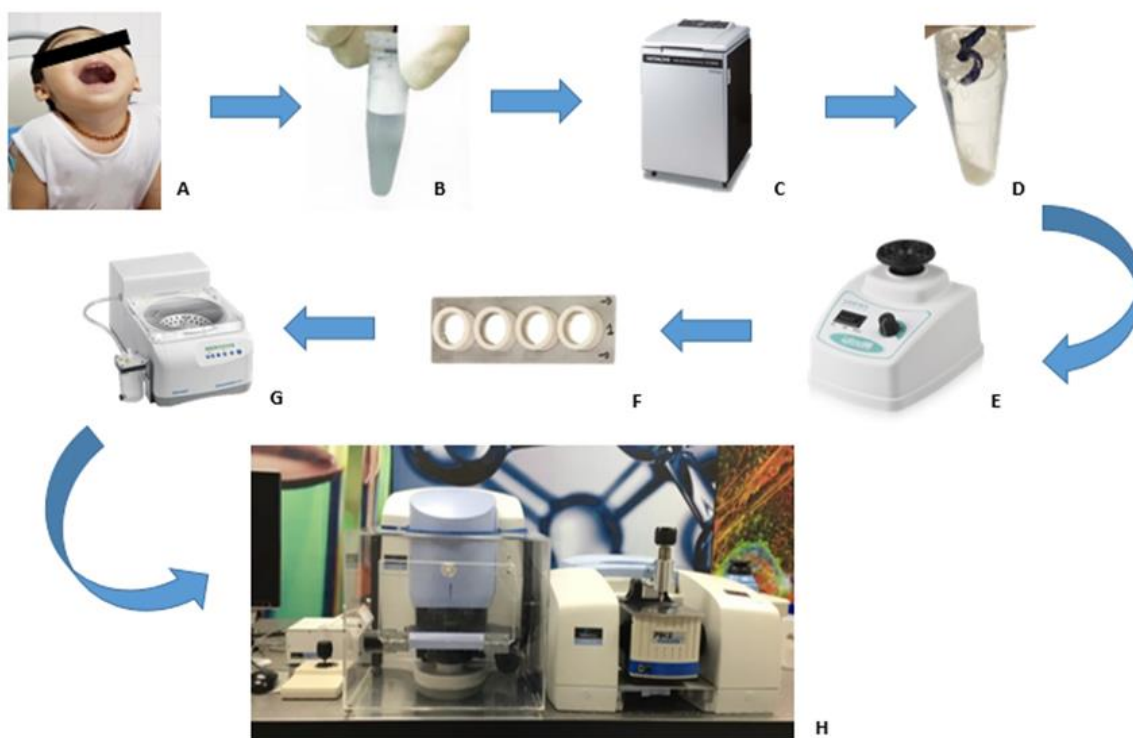
As amostras de saliva foram descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas em um agitador vórtex (Fluxograma 2E). Após este procedimento, 20 μL foram depositados sobre janelas de fluoreto de cálcio (CaF_2) (Fluxograma 2F) e desidratados por 10 minutos, com o auxílio de um Concentrador Eppendorf 5301 (Fluxograma 2G), a fim de corrigir a intensa absorção de água pela técnica de Espectroscopia FT-IR.

A obtenção dos espectros para este estudo foi realizada pelo espectrofotômetro Spectrum 400, acoplado a um microscópio (Perkin-Elmer, Spotlight 400) e controlado pelo Software Spotlight 400 (Fluxograma 2H). A aquisição dos espectros das amostras

foi realizada no intervalo espectral de $4000 - 900 \text{ cm}^{-1}$, com 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

As medidas foram realizadas em oito pontos aleatórios ao longo do filme fino de saliva formado sobre as janelas de CaF_2 , utilizando valores de absorvância entre 0,5 e 0,7 unidade de absorvância (u.a.). Considerando todas as amostras do grupo A e Grupo N foi obtido um total de 304 espectros.

Fluxograma 2– Processamento da amostra para análise FT-IR. 2A) posição correta para a coleta da saliva. 2B) saliva coletada no tubo estéril de 1,5 mL. 2C) equipamento de centrifugação CF 16RN-Hitachi. 2D) divisão do sobrenadante e precipitado na saliva. 2E) agitador vórtex. 2F) janelas de fluoreto de cálcio (CaF_2). 2G) Concentrador Eppendorf 5301. 2H) Espectrofotômetro Spectrum 400, acoplado a um microscópio (Perkin-Elmer, Spotlight 400).



Fonte: Acervo do autor.

4.6 Teste imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays - ELISA)

Foram mensuradas as concentrações de lactoferrina nas amostras de saliva dos grupos A e N usando o teste imunoenzimático, mais conhecido como *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). As amostras de saliva, após terem sido descongeladas em temperatura ambiente e homogeneizadas em um agitador vórtex,

foram diluídas em 1/150 e submetidas aos procedimentos de análise, conforme descrito no manual do Kit Lactoferrina Humana (MyBioSource, Inc., San Diego, EUA).

A leitura da placa (absorbância) foi realizada na Universidade Estadual Paulista (UNESP), utilizando um leitor de microplacas no comprimento de onda de 450 nm (Elx808cse, Cambrex Corporation, EUA), controlado pelo software Gen5 (Biotek).

4.7 Análise estatística

Os dados coletados pela Espectroscopia FT-IR foram submetidos à análise estatística, primeiramente, pela padronização dos espectros, com correção de linha de base, normalização (0-1) e aquisição das médias.

Em seguida, foi realizada a análise por segunda derivada com o intuito de identificar e quantificar todas as sub-bandas que formam o espectro infravermelho médio da saliva de ambos os grupos.

A partir dessa análise, foi possível fazer a deconvolução das bandas para a obtenção da área relativa de cada banda e, assim, descobrir quais delas apresentam maiores contribuições na composição da saliva.

Por sua vez, para a análise estatística dos dados obtidos pela técnica de ELISA, foi obtida a concentração de lactoferrina (ng/ml) de cada amostra a partir da curva de calibração (Absorbância versus concentração de lactoferrina).

As análises foram feitas utilizando os programas Excel 2007, OriginPro 8.5 e OPUS (Versão 4.2, Bruker).

5 RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão apresentados em três grandes secções, de modo que a primeira mostrará a caracterização dos participantes desse estudo, a segunda, os resultados da análise pelo teste imunoenzimático específico para detecção de lactoferrina humana e a terceira, os resultados da análise realizada por espectroscopia FT-IR.

5.1 Caracterização dos participantes

Participaram desse estudo 38 indivíduos entre 5 a 15 anos, sendo 19 desses participantes sem diagnóstico de TEA, também chamados de neurotípicos (Grupo N), 7 do sexo feminino e 12 do sexo masculino, com idade média \pm DP de $9,6 \pm 2,5$ anos, e 19 participantes diagnosticados previamente com TEA por profissionais qualificados, entre eles psiquiatra e/ou neurologista (Grupo A), 2 do sexo feminino e 17 do sexo masculino, com idade média \pm desvio padrão (DP) de $12,2 \pm 2,4$ anos.

Em relação ao início dos sintomas de TEA, o menor período relatado foi de 0 a 6 meses e o maior período foi acima de 36 meses, sendo que 9 participantes apresentaram o início dos sintomas na faixa de 12 a 18 meses de idade. Já em relação a idade do diagnóstico, houve variação entre 18 meses a 9 anos de idade, com idade média \pm DP de $5,3 \pm 2,2$ anos. Além disso, a idade de início da intervenção precoce variou entre 2,5 a 7 anos, com idade média \pm DP de $4,4 \pm 1,4$ anos.

Os principais sinais iniciais relatados foram: atraso ou ausência da fala, com repetições de palavras e/ou frases, também chamado de ecolalia, e, em alguns casos, a criança parou de falar em certa idade; falta de contato visual e interação social, não respondendo ao ser chamado pelo nome; isolamento; déficit na compreensão de expressões faciais de emoções e uso gestos; dificuldade para compreender brincadeiras; padrões repetitivos de comportamento, como estereotípias motoras e empilhar, alinhar e/ou separar por cores objetos e brinquedos; e atraso para caminhar ou andar nas pontas dos pés.

Outros comportamentos também citados foram: agressividade; agitação; impaciência; irritabilidade; ansiedade; medo; dificuldade em prestar atenção; se jogar no chão; choros e gritos constantes; hiper-reatividade a barulhos; aversão a contato físico, com exceção à mãe; insônia; e tratar a si mesmo na terceira pessoa.

Dentre os jovens diagnosticados com TEA, 14 fazem uso de medicamentos, sendo os antipsicóticos os mais utilizados, principalmente a Risperidona e a Periciazina. Outros antipsicóticos relatados foram Haloperidol, Levomepromazina, Pimozida e Aripiprazol.

Anticonvulsivantes/estabilizadores de humor também se destacam, principalmente o Valproato de sódio, além de Fenitoína e Topiramato. Antidepressivos, como Imipramina, e ansiolíticos, como Fluoxetina, também eram utilizados.

Outros medicamentos foram citados para tratamento de Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH - Ritalina), disfunções da tireoide (Levotiroxina), níveis elevados de colesterol (Ciprofibrato), rinite alérgica e asma (Dipropionato de Beclometasona e Imunoterapia). Além disso, dois participantes relataram ter escoliose e um participante apresentava diagnóstico de Síndrome de Dandy-Walker, que é uma malformação no cérebro caracterizada por hipoplasia ou agenesia do vermis cerebelar, dilatação cística do quarto ventrículo, alargamento da fossa posterior e hidrocefalia (FONSECA *et al.*, 2017).

Por sua vez, em relação aos participantes neurotípicos, apenas quatro fazem uso de medicamento, sendo eles: Somatropina, que é um hormônio de crescimento; Levotiroxina sódica, para tratamento de hipotireoidismo; Cloridrato de Ranitidina, para tratamento de gastrite e refluxo; e Periciazina, um antipsicótico.

Em relação às mães e gestações/partos dos componentes do grupo neurotípicos, a idade de gravidez variou entre 20 a 34 anos, com idade média \pm DP de $28,0 \pm 4,3$ anos. Problemas de saúde e complicações durante a gravidez foram relatados apenas por 3 mães, sendo eles diabetes gestacional, disfunções na tireoide, endometriose, cistite e dislipidemia. Apenas 3 mães relataram o uso de medicamentos durante a gestação, sendo eles o sulfato ferroso e antibiótico. Nenhuma mãe relatou o uso drogas lícitas e/ou ilícitas.

Por sua vez, a respeito do parto e da quantidade de semanas para o nascimento, 17 mães relataram parto cesariana e 2 relataram parto normal, com variação das semanas de nascimento do bebê entre 34 e 40 semanas, com média \pm DP de $38,6 \pm 1,3$ semanas.

Em relação às mães e respectivas gestações/partos no grupo de indivíduos com TEA, a idade de gravidez variou entre 19 a 39 anos, com idade média \pm DP de $30,7 \pm 6,3$ anos. Um total de 10 mães relataram problemas de saúde e complicações durante

a gravidez, como anemia falciforme, colesterol elevado, deficiência de proteína S, disfunções na tireoide, enxaqueca, rinite alérgica, diabetes, pneumonia, pré-eclâmpsia, rompimento precoce da bolsa amniótica e, principalmente, hipertensão.

O uso de medicamentos durante a gestação foi relatado por 7 mães, sendo eles ácido fólico, sulfato ferroso, antibiótico, Metildopa, Diclofenaco, Dimenidrinato, Puran T e Acetilcisteína. Em relação ao uso drogas lícitas e/ou ilícitas, apenas 1 mãe relatou tabagismo.

Por sua vez, a respeito do parto e da quantidade de semanas para o nascimento, 11 mães relataram parto cesariana e 8 relataram parto normal, com uma variação das semanas de nascimento do bebê entre 32 e 41,5 semanas, com média \pm DP de $37,8 \pm 2,3$ semanas. O Quadro 3 apresenta as características com relação a gestação e partos das mães dos grupos N e A.

Quadro 3 - Características com relação a gestação e partos dos grupos N e A.

	Idade da gravidez	Problemas de saúde/complicações	Medicamentos	Drogas lícitas e/ou ilícitas	Parto	Semanas de nascimento
Grupo N	20 a 34 anos	15,8 %	15,8 %	Nenhum caso	Cesariana 89,5 %	34 a 40 semanas
	$28,0 \pm 4,3$ anos	- Diabetes gestacional - Disfunções na tireoide - Endometriose - Cistite - Dislipidemia	- Sulfato ferroso - Antibiótico		Normal 10,5 %	$38,6 \pm 1,3$ semanas
Grupo A	19 a 39 anos	52,6 %	36,8 %	5,2 %	Cesariana 57,9 %	32 a 41,5 semanas
	$30,7 \pm 6,3$ anos	- Hipertensão - Anemia falciforme - Colesterol elevado - Deficiência de proteína S - Disfunções na tireoide - Enxaqueca - Rinite alérgica - Diabetes - Pneumonia - Pré-eclâmpsia - Rompimento precoce da bolsa amniótica	- Ácido fólico - Sulfato ferroso - Antibiótico - Metildopa - Diclofenaco - Dimenidrinato - Puran T - Acetilcisteína	Tabagismo	Normal 42,1%	$37,8 \pm 2,3$ semanas

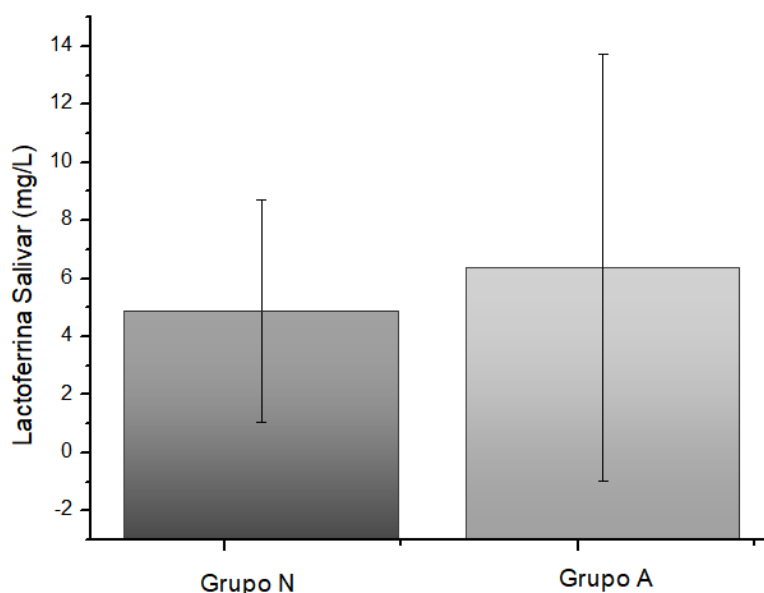
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Teste imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays - ELISA)

Os valores das concentrações de lactoferrina em amostras de saliva do grupo N e A, obtidos por ELISA são mostrados na Figura 11. A média \pm DP encontrada para as concentrações do grupo N foi $4,9 \pm 3,8$ mg/L, enquanto que do grupo A foi $6,4 \pm 7,3$ mg/L.

Considerando a concentração normal da lactoferrina salivar \pm DP em $8,4 \pm 10,3$ mg/L, para saliva não estimulada, os resultados não apresentaram significância estatística.

Figura 11 - Média \pm DP da concentração de lactoferrina do grupo N e A, obtidos por ELISA.



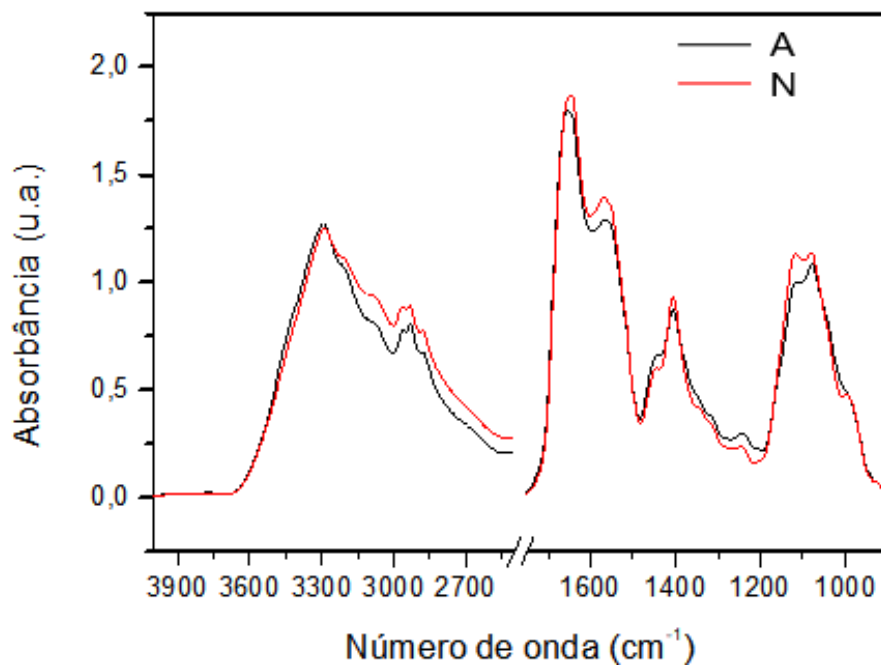
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Análise da saliva por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Para analisar os espectros de saliva dos grupos N e A, utilizou-se a análise pela segunda derivada com a deconvolução das bandas, a fim de identificar as informações bioquímicas das moléculas que compõem as diferenças entre os grupos.

A Figura 12 apresenta o gráfico dos espectros médios das amostras de saliva obtidos dos grupos N e A pela técnica de FT-IR, revelando regiões com diferenças na intensidade e/ou configuração das bandas de absorção.

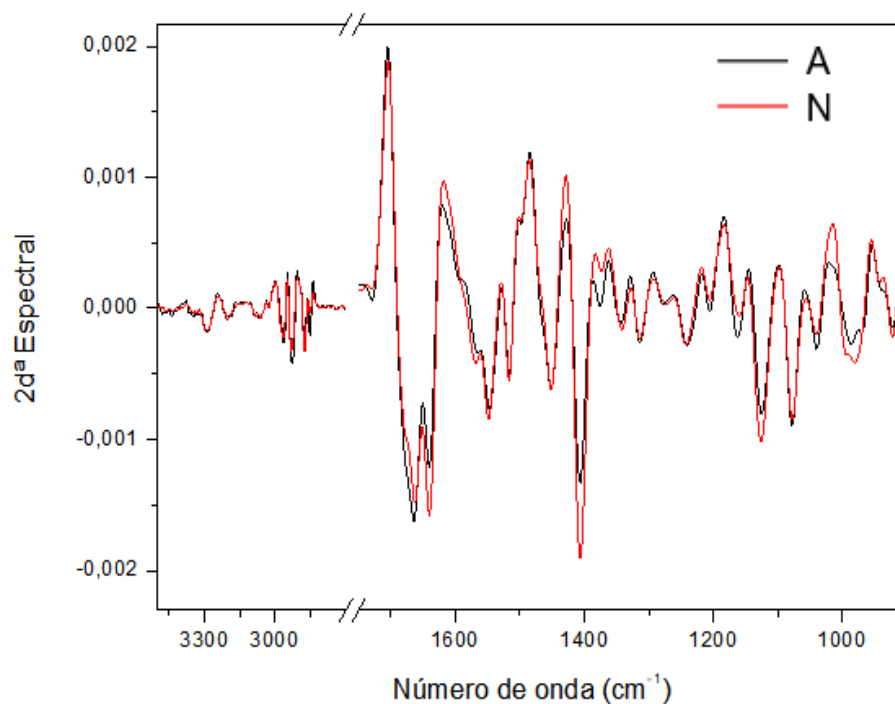
Figura 12 - Gráfico dos espectros médios das amostras de saliva, dos grupos N e A, obtidos pela técnica de Espectroscopia FT-IR.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise pela segunda derivada foi utilizada com o intuito de ampliar a visualização dessas diferenças espectrais, conforme demonstrado na figura 13.

Figura 13 - Segunda derivada dos espectros médios das amostras de saliva dos grupos N e A.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O Quadro 4 apresenta as atribuições dos modos vibracionais feitas pela segunda derivada dos espectros FT-IR dos grupos A e N, bem como os resultados de deconvolução de bandas, com seus respectivos valores de área e área relativa entre os grupos.

Quadro 4 - Valores de área obtidos na deconvolução de bandas e atribuição dos modos vibracionais e das principais moléculas presentes na saliva. (Continuação)

Neurotípico		TEA		Diferença (%)	Modos Vibracionais	Moléculas Salivares
Nº de onda (cm ⁻¹)	Área (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área (%)			
922	0,08	928	0,15	-0,07	v(PO ₂ ⁻) δ(COH), v(COC) v _{as} (CH ₃ N), v(CC), v(CO), v(CH ₂ OH)	- Fosfatos inorgânicos; - Carboidratos; - Fosfolipídios (lipídios de membrana); - Hélice esquerda de DNA (forma Z).
980	1,59	980	1,59	0,00	v(PO ₂ ⁻) v(PO ₄), v(CC), v(CO), v(CH ₂ OH)	- Fosfatos inorgânicos; - Ácidos nucleicos e proteínas.
993	2,93	996	3,35	-0,42	δ _s (CH ₃), δ(CC) v(CO) da ribose/v(CC) e uracila do RNA	- Polissacarídeos; - Ácido nucleico (RNA).
1040	4,68	1042	5,89	-1,21	v(OH), δ(OH) v(CO), δ(COH) v _s (PO ₂ ⁻)	- Carboidratos (glicogênio); - Carboidratos (glicose, frutose, glicogênio, etc), proteínas glicosiladas (α-amilase, mucinas) e moléculas de açúcar; - Ácidos nucleicos (esqueleto açúcar-fosfato: RNA e DNA).
1079	8,76	1080	7,43	1,33	v(CO), v(CC), v _{as} (COC), δ(COH) v _s (PO ₂ ⁻), v _{as} (PO ₂ ⁻), v _s (CO-O-C)	- Carboidratos - Fosfatos inorgânicos, fosfolipídios (lipídios de membrana) e grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos (esqueleto açúcar-fosfato).
1124	9,92	1122	7,90	2,02	v(CO), v(COC), Resíduo de sacarídeo fosforilado Manose-6-fosfato v(CO) da ribose do RNA v _s (P-O-C)	- Carboidratos; - Proteína (glicoproteína); - Ácidos nucleicos (RNA); - Fosfolipídios (lipídios de membrana)
1162	1,77	1161	2,77	-1,00	v(CO), v(COH) v _{as} (CO-O-C) v _{as} (PO ₂ ⁻) v(CO) da ribose do RNA	- Carboidratos e proteínas (serina, treonina, tirosina de proteínas); - Lipídio; - Fosfatos inorgânicos; - Ácidos nucleicos (RNA).
1202	1,49	1204	1,37	0,12	v _{as} (PO ₂ ⁻)	- Fosfatos inorgânicos.

Quadro 4 - Valores de área obtidos na deconvolução de bandas e atribuição dos modos vibracionais e das principais moléculas presentes na saliva. (Continuação...)

Neurotípico		TEA		Diferença (%)	Modos Vibracionais	Moléculas Salivares
Nº de onda (cm ⁻¹)	Área (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área (%)			
1241	0,64	1241	1,70	-1,06	$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ $\nu(\text{CN})$ – Amida III	- Fosfatos inorgânicos, grupo fosfato de fosfolípidios, grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos e proteína fosforilada. - Proteínas (Colágeno).
1276	2,06	1277	1,84	0,22	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$ Amida III - Componentes de proteínas	- Proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, slgA). - Hormônios (cortisol, testosterona).
1315	1,52	1314	1,95	-0,43	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$ Amida III - Componentes de proteínas	
1345	2,25	1344	2,28	-0,03	$\nu(\text{COO}^-), \delta_s(\text{CH}_2)$ Amida III	
1375	2,31	1376	3,32	-1,01	$\nu(\text{CN}), \delta(\text{NH})$ Amida II	
1406	6,06	1406	4,59	1,47	$\delta_s(\text{CH}_3)$ $\nu_s(\text{COO}^-)$	- Proteínas (grupos metil); - Lipídios (ácidos graxos) e proteínas (aminoácidos).
1448	4,52	1449	6,68	-2,16	$\delta_{as}(\text{CH}_3)$ $\delta_s(\text{CH}_2)$	-Proteínas (grupos metil); -Lipídios; -Hormônios (Cortisol).
1493	2,27	-	-	*	$\nu(\text{CC}), \delta(\text{CH})$	- Proteínas.
1515	1,36	-	-	*	Banda tirosina	- α -hélice: proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, slgA), aminoácidos (tirosina).
-	-	1521	6,68	*	$\delta(\text{NH}), \nu(\text{CN}), \nu(\text{CC})$ - Amida II	
1543	8,88	1547	4,03	4,85	$\delta_s(\text{NH}), \nu(\text{CN})$ Amida II - banda de vibração dos grupos de peptídeos em proteínas	- Proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, slgA).
-	-	1570	5,34	*	$\delta(\text{NH}), \nu(\text{CN})$ - Amida II	- Proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, slgA), arginina, adenina.
1582	11,11	-	-	*	Vibrações assimétricas de estiramento do radical carboxil de grupos carboxilato, como aqueles em ácido láctico ou cadeias laterais de proteína $\nu(\text{anel CC})$ do fenil	
-	-	1599	7,86	*	$\delta(\text{NH}), \nu(\text{CN})$ - Amida II	- α -hélice: proteínas (α -amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, slgA), aminoácidos.

Quadro 4 - Valores de área obtidos na deconvolução de bandas e atribuição dos modos vibracionais e das principais moléculas presentes na saliva. (Conclusão)

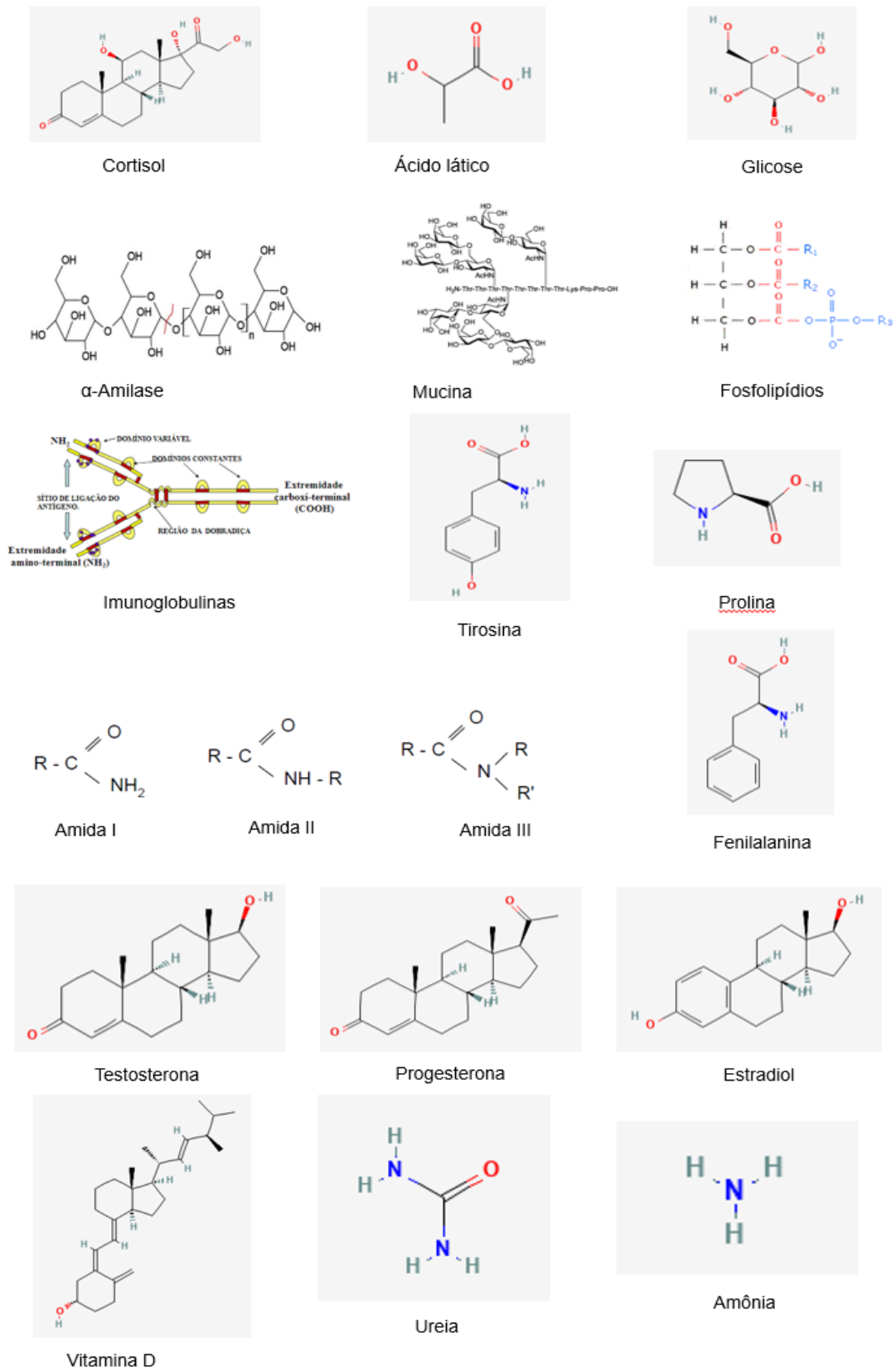
Neurotípico		TEA		Diferença (%)	Modos Vibracionais	Moléculas Salivares
Nº de onda (cm ⁻¹)	Área (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área (%)			
1637	16,10	1634	8,16	7,94	v(CO), v(CN), δ(NH) Amida I de estruturas folhas β-pregueadas	- Proteínas (α-amilase, albumina, cistatinas, mucinas, proteínas ricas em prolina, sIgA). - Lipídios, fosfolipídios (lipídios de membrana) e ésteres de ácidos graxos.
1672	9,68	1667	14,09	-4,41	v(CO), v(CN), δ(NH) Amida I de estruturas α-hélice Amida I de estruturas folhas β-pregueadas	
-	-	1684	1,03	*	v(CO), δ(NH) Amida I - Componentes resultantes de folhas pregueadas antiparalelas e voltas β de proteínas	
-	-	1735	0,01	*	v(CO) de ésteres de lipídios	

Legenda: v = vibrações de estiramento; δ = vibrações de deformação angular; s = vibrações simétricas; as = vibrações assimétricas. Para as atribuições dos modos vibracionais foram utilizadas as seguintes referências: Bel'skaya; Sarf; Makarova (2018); Bel'skaya; Sarf; Solomatin (2020); Ferreira et al. (2020); Caetano Júnior; Strixino; Raniero (2015); Khaustova et al. (2010); Lopes et al. (2016); Movasaghi; Rehman; Rehman (2008); Naseer; Ali; Qazi (2021); Paluszkiwicz et al. (2020); Rodrigues et al. (2019).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Correlacionando as bandas detectadas na análise pelo FT-IR, no presente estudo, aos componentes presentes na saliva, com base em resultados de pesquisas já publicadas (Quadro 4), observa-se expressiva presença de ligações entre moléculas de Carbono, Oxigênio, Hidrogênio e Nitrogênio que, dependendo de modificações em seus modos vibracionais, podem apresentar alterações na banda em que são identificadas. Na Figura 14, são apresentadas as fórmulas dos principais componentes da saliva, onde se observam as principais moléculas e tipos de ligações.

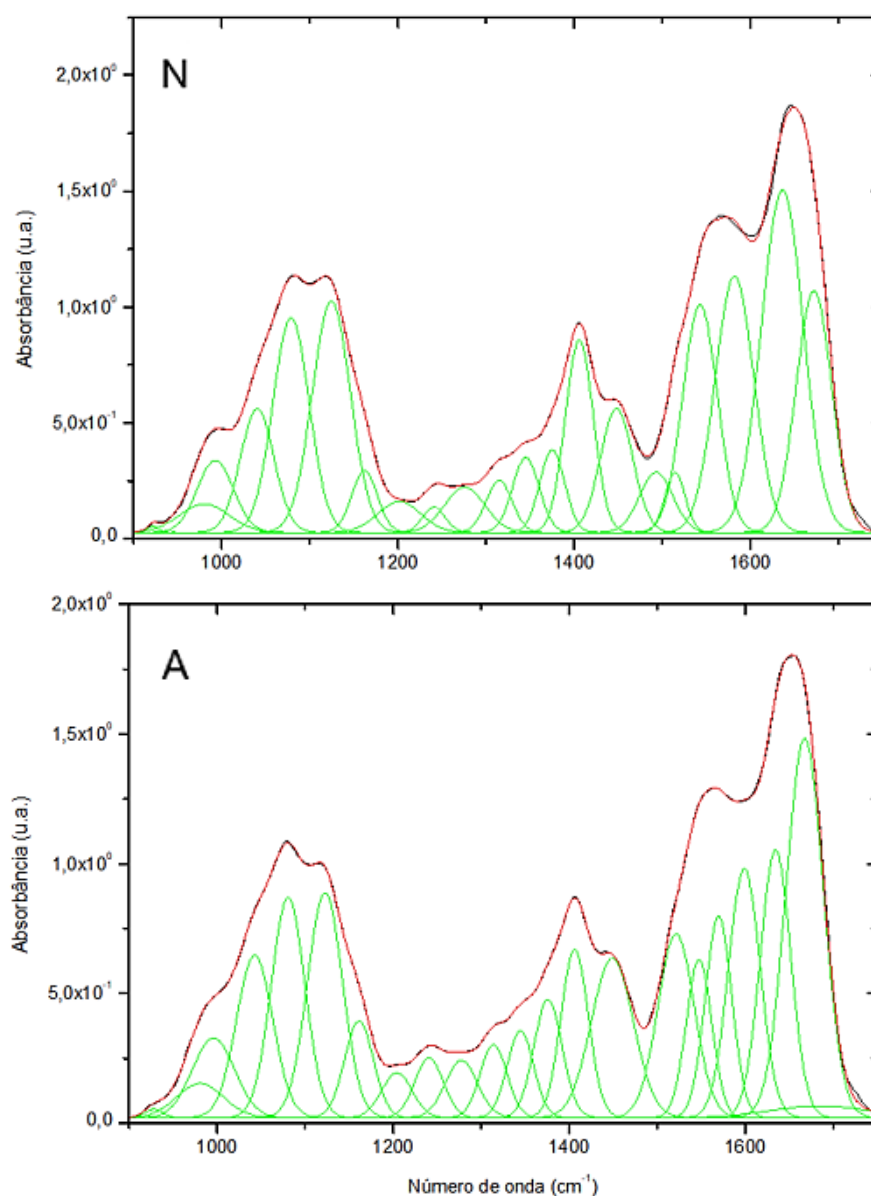
Figura 14 - Fórmulas das principais moléculas da saliva, onde se observam sua estrutura química e os tipos de ligações.



Fonte: Pub Chem Compound (2022a; 2022b; 2022c; 2022d; 2022e; 2022f) e Aalto Scientific (2022).

A Figura 15 mostra a deconvolução de bandas na região 922 - 1803 cm^{-1} , relacionadas a moléculas salivares ligadas ao grupo fosfato, carboidratos, ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas e hormônios.

Figura 15 - Deconvolução de bandas da região 922 - 1803 cm^{-1} de espectros FT-IR da saliva dos grupos N e A.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir da deconvolução, foi possível observar diferenças entre os grupos em relação as sub-bandas e aos valores de área das gaussianas, o que indica alterações bioquímicas da saliva.

Nos espectros do grupo A foram encontradas cinco bandas, 1521, 1570, 1599, 1684 e 1735 cm^{-1} , ausentes nos espectros do grupo N, enquanto que as bandas 1493,

1515 e 1582 cm^{-1} foram encontradas somente nos espectros do grupo N, conforme Figura 14. Estas regiões correspondem, respectivamente, a proteínas, amida II, amida I e estiramento C=O de ésteres de lipídios.

Nas bandas 1667 e 1672 cm^{-1} , relacionadas a Amida I de proteínas, a diferença relativa entre as áreas é maior no grupo A, ou seja, apresentam uma banda mais larga e, conseqüentemente, maior contribuição desse radical molecular na composição da saliva.

Por sua vez, as bandas 1543 e 1547 cm^{-1} e 1634 e 1637 cm^{-1} , correspondentes a Amida I e II de proteínas, favorecem o grupo N, uma vez que esse grupo apresenta uma área relativa maior.

6 DISCUSSÃO

Dando início a discussão dos resultados obtidos, é importante caracterizar os participantes do estudo, de modo a identificar os possíveis fatores de risco que podem contribuir para o desenvolvimento do Transtorno do Espectro Autista.

Além de fatores genéticos, os principais fatores de risco associados ao TEA podem ser elencados em características parentais e fatores pré-natais, perinatais e/ou pós-natais (ALMEIDA *et al.*, 2018; LYALL *et al.*, 2017). A idade materna avançada no período de gestação, acima de 35 anos, é uma das características mais estudadas em relação ao aumento do risco de TEA (AL-MAMARI *et al.*, 2021; HADJKACEM *et al.*, 2016; SANDIN *et al.*, 2012; SLAMA *et al.*, 2022).

De acordo com Sandin *et al.* (2012), por meio de estudo de metanálise, o risco relativo de desenvolvimento de TEA em mães de 35 anos ou mais, se comparado às mães de 25 a 29 anos, é de 1,52. Em outro estudo de metanálise, realizado por Wu *et al.* (2016), foi relatado que um aumento de 10 anos na idade materna está associado a um risco 18% maior para o desenvolvimento do TEA.

Em nossa amostra, a idade materna média do grupo A foi de $30,7 \pm 6,3$ anos, não havendo diferença significativa em relação a idade materna média do grupo N, que foi de $28,0 \pm 4,3$ anos. Dessa forma, não é possível presumir que a idade materna avançada teve associação com TEA em nosso estudo. No entanto, a frequência de mães com 35 anos ou mais no grupo A foi de 36,8%, enquanto todas as mães do grupo N estavam abaixo dessa faixa etária.

Nossos resultados corroboram os estudos de Hadjkacem *et al.* (2016), que relataram frequência de 24% de mães com idade maior que 35 anos em de indivíduos autistas em comparação a 19% de seus irmãos neurotípicos, e de Fezer *et al.* (2017), que apresentou idade materna média de $29,8 \pm 4,1$ anos.

Entre os fatores pré-natais, elencam-se doenças e complicações que surgem durante a gravidez e que, possivelmente, podem estar associados ao maior risco de desenvolvimento de TEA. São eles: diabetes gestacional; hipertensão; infecções gestacionais; doenças autoimunes; exposição a medicamentos, especialmente ácido valproico, a poluição e a produtos químicos; sofrimento fetal; deficiência de ácido fólico; tabagismo; perda de líquido amniótico; sangramentos durante a gestação; entre outros (ALMEIDA *et al.*, 2018; HADJKACEM *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2015; ORNOY; LIZA; ERGAZ, 2016; SHEN *et al.*, 2020; ZERBO *et al.*, 2016).

No entanto, o estudo de Hadjkacem *et al.* (2016), não encontrou relevância estatística na associação dos fatores pré-natais e TEA, embora a prevalência de doenças tenha sido mais alta nesses indivíduos. A atual pesquisa relatou aumento expressivo de problemas de saúde durante a gestação nas mães do grupo A (52,6%) em comparação ao grupo N (15,8%), com predomínio de Hipertensão e Diabetes mellitus (DM), além de infecções e pré-eclâmpsia. Foi observado, também, aumento de 21% no uso de medicamentos pelas mães de indivíduos com TEA em relação à neurotípicos. Entretanto, não há na literatura associação dos medicamentos citados com TEA.

Com relação a DM, alguns autores associaram, principalmente, a distúrbios do crescimento fetal e maior taxa de complicações na gravidez, relatando que pode afetar a coordenação motora e aumentar a taxa de Transtorno de déficit de atenção, comorbidade neurocomportamental comum no TEA (ORNOY *et al.*, 2001).

Por sua vez, com relação a infecções, estudos sugerem que sua associação com TEA está relacionada com o processo inflamatório intrauterino materno, ativando o sistema imune materno e a ocasionando a desregulação da liberação de citocinas, que podem desempenhar um importante papel no transtorno do neurodesenvolvimento (HADJKACEM *et al.*, 2016; ORNOY; LIZA; ERGAZ, 2016).

Ainda com relação aos fatores pré-natais, também foi avaliada a influência do tabagismo no desenvolvimento do TEA. No entanto, estudos não relataram aumento de risco relacionado a esse aspecto, corroborando os resultados do presente estudo (HAGLUND; KÄLLÉN, 2011; ORNOY; LIZA; ERGAZ, 2016).

Com relação aos fatores perinatais, encontram-se as características do parto, como nascimento prematuro, tipo de parto, hipóxia perinatal, pré-eclâmpsia, sofrimento fetal agudo e baixo peso ao nascer, entre outros. Esses fatores podem contribuir para a inflamação no cérebro, possivelmente, correlacionada à fisiopatologia do TEA (FEZER *et al.*, 2017; GARDENER; SPIEGELMAN; BUKA, 2011; GLASSON *et al.*, 2004; HAGLUND; KÄLLÉN, 2011).

O grande aumento nas taxas de sobrevivência de recém-nascidos pré-termo na última década desperta preocupações com relação às consequências neurológicas da prematuridade a longo prazo. Diversos trabalhos demonstraram que o parto prematuro aumenta o risco de TEA (GARDENER; SPIEGELMAN; BUKA, 2011; GUINCHAT *et al.*, 2012a; LAMPI *et al.*, 2012). No entanto, ainda não foi esclarecido se o TEA está relacionado à própria prematuridade ou às comorbidades relacionadas

a ela, já que recém-nascidos que posteriormente são diagnosticados com TEA têm taxas aumentadas de complicações perinatais (BUCHMAYER *et al.*, 2009; FEZER *et al.*, 2017; KUZNIEWICZ *et al.*, 2014). No presente estudo, observou-se apenas 5,3% de casos de prematuridade no grupo N, enquanto no grupo A, 26,3% dos partos foram prematuros, sendo necessários estudos complementares para poder correlacionar esse fator ao TEA.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado com relação ao tipo de parto, lembrando que cada país tem políticas de saúde específicas. No Brasil, estudo realizado por Nakano, Bonan e Teixeira (2015) relatou a normalização da cesária como modo de nascer, considerando que as mulheres reivindicam para si o poder sobre as escolhas feitas no processo de nascimento dos seus filhos, induzindo a um aumento expressivo no número de partos cesariano, prejudicando essa análise (GUINCHAT *et al.*, 2012a)

Com relação aos indivíduos da amostra analisada, observou-se predomínio do sexo masculino em ambos os grupos, em concordância com diversos estudos anteriores (AL-MAMARI *et al.*, 2021; BHUIYAN *et al.*, 2021; JACK *et al.*, 2021; MAENNER *et al.*, 2020; POSSERUD *et al.*, 2021). O motivo dessa predominância não está bem esclarecido, porém estudos sugerem que as diferenças dos sintomas e a maior compensação das dificuldades observada no sexo feminino, podem levar a uma diminuição do diagnóstico de TEA nessa população (BARGIELA; STEWARD; MANDY, 2016; WILSON *et al.*, 2016).

Quanto a faixa etária, no grupo A, destacou-se indivíduos de idade mais avançada (11 a 15 anos) e, no grupo N, idades mais tenras (5 a 11 anos). Ressalta-se que a faixa etária do grupo A caracteriza a adolescência, que poderia estar associada um aumento de hormônios sexuais circulantes (BAKKER-HUVENAARS *et al.*, 2018). No entanto, em virtude da amostra reduzida, nada pôde ser inferido com relação a esse aspecto.

Um ponto que merece destaque é a idade média de diagnóstico, que no presente estudo, foi de $5,3 \pm 2,2$ anos, concordando com os resultados relatados pelos estudos de Zanon, Backes e Bosa (2017) e Fernandes *et al.* (2017). Chama atenção a ampla faixa de variação, entre 18 meses e 9 anos, comprovando a dificuldade de diagnóstico precoce e a ausência de testes laboratoriais ou genéticos que permitam antecipar, de forma confiável, a presença desse transtorno, muitas vezes evidenciado após o início do período escolar (MADASCHI, 2021; ZANON; BACKES; BOSA, 2017). Vale ressaltar que o diagnóstico de TEA nas crianças brasileiras parece ser tardia quanto

comparado com outros países (ZANON; BACKES; BOSA, 2017). Como consequência desse atraso no diagnóstico, há um retardo no início da intervenção, observado em nosso estudo (2,5 a 7 anos), com irreversível prejuízo na qualidade de vida desses indivíduos (MADASCHI, 2021; MANOHAR *et al.*, 2019; ZANON; BACKES; BOSA, 2017).

O tratamento atualmente preconizado é individualizado, porém inespecífico, envolvendo o uso diversos tipos de medicamentos, que não tratam o TEA em si, mas buscam minimizar alguns dos sintomas associados ao autismo, como irritabilidade, e comorbidades, como ansiedade (BRASIL, 2014; SILVA *et al.*, 2020; LEITE; MEIRELLES; MILHOMEM, 2015). No presente estudo, observou-se um número expressivo de indivíduos do grupo A sob tratamento farmacológico (73,7%), em comparação com o grupo N (21%), em concordância com estudos anteriores (ALMEIDA; LIMA; BARROS, 2018; COSTA; ABREU, 2021; FERNANDES *et al.*, 2017; LEITE; MEIRELLES; MILHOMEM, 2015).

Em relação aos sinais iniciais relatados com maior frequência pelas mães dos participantes, destacam-se: atraso ou ausência da fala, repetições de palavras e/ou frases (78,9%); alteração de comportamento (agressividade, agitação, irritabilidade, hiper-reatividade a barulhos, entre outros) (63,2%); falta de contato visual e interação social (36,8%); padrões repetitivos e estereotipados de comportamento (36,8%); isolamento (21%); atraso para caminhar (15,8%); e déficit na compreensão de expressões faciais, gestos e brincadeiras (10,5%). Todos esses indicativos estão de acordo com a descrição do Transtorno do Espectro Autista apresentado no DSM-V, bem como em diversos estudos que também relataram a prevalência desses sinais iniciais (ALMEIDA; LIMA; BARROS, 2018; CARVALHO *et al.*, 2013; GUINCHAT *et al.*, 2012b; HOMERCHER *et al.*, 2020; OZONOFF *et al.*, 2010).

Considerando a semelhança da composição bioquímica da saliva em relação ao sangue, foi observado um aumento exponencial de estudos com análise da saliva na busca do diagnóstico de diversas alterações orgânicas (BOROUMAND *et al.*, 2021; KUŁAK-BEJDA *et al.*, 2019; MALAMUD, 2011; PASCHOTTO *et al.*, 2020; SILVA, 2017b).

A saliva é um fluido biológico complexo, composto principalmente por água e componentes orgânicos e inorgânicos, como os cátions ativos (Na^+ , K^+ , Ca^{+2}) e ânions (Cl^- , HCO_3^-). Estão presentes, ainda, aminoácidos, enzimas, anticorpos, constituintes antimicrobianos e hormônios, como cortisol e testosterona (KHAUSTOVA *et al.*, 2010;

SCHULTZ *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2016). Contudo, a composição final da saliva depende fortemente da taxa de fluxo salivar, sendo que sua composição final pode ser afetada pelo grau de hidratação e sua produção estimulada pelos sentidos, posição do corpo, estresse físico e psicológico, alimentação, medicamentos, entre outros (KAUFMAN; LAMSTER, 2002; KIM; SUH, 2001).

Como a alimentação pode aumentar a concentração de proteínas totais e enzimas, como a α -amilase, alterando a composição salivar (CHIAPPIN *et al.*, 2007), foi orientado a todos os indivíduos voluntários a realizarem um jejum de no mínimo 2 horas antes do procedimento de coleta.

Uma das funções da saliva é a manutenção da saúde bucal, pela remoção dos restos alimentares, capacidade tampão, ação antimicrobiana e promoção da remineralização do esmalte (MOURA *et al.*, 2007; OSÓRIO *et al.*, 2000). Essas funções não são executadas com sucesso quando a taxa de fluxo salivar está reduzida, característica frequentemente observada em crianças com TEA, que frequentemente apresentam estresse elevado e hábitos alimentares e higiene bucal deficientes, elevando os riscos de cárie e doenças periodontais (KIM; SUH, 2001; MORALES-CHÁVEZ; VILLARROEL-DORREGO; SALAS, 2019; OSÓRIO *et al.*, 2000; PI *et al.*, 2020).

É importante destacar, também, que o público-alvo desse estudo, indivíduos diagnosticados com TEA, apresentam dificuldades de relacionamento e contato físico e, por isso, devem ser tratados com muito cuidado. A coleta de saliva, como dito anteriormente, induz um estresse muito menor do que a de sangue, que depende de instrumentos invasivos e pode apresentar dificuldades (PUTNAM *et al.*, 2012; SILVA, 2017b).

A primeira análise do presente estudo buscou avaliar a concentração de lactoferrina na saliva, com aplicação do teste imunoenzimático (ELISA), considerando que estudos indicaram alterações nos valores dessa glicoproteína em indivíduos com TEA nesse fluido e nas fezes (ABDULHUSEIN, 2017; KUSHAK *et al.*, 2016; MARTIROSIAN *et al.*, 2011). Em concordância com os nossos resultados, não houve significância estatística com relação a esse biomarcador devido ao alto desvio padrão, embora os valores estivessem alterados. Dessa forma, entende-se que a lactoferrina não pode ser considerada como um marcador específico para diagnóstico de TEA.

Acrescenta-se que os testes imunoenzimáticos, como o ELISA, apresentam custo e tempo de leitura elevados e maior probabilidade de erros na execução dos

procedimentos, uma vez que apresenta diversas etapas e reagentes em diferentes concentrações, podendo alterar os resultados da análise (VIDAL; CATAPANI, 2005).

Os resultados do presente estudo, inédito nessa análise de saliva pela Espectroscopia FT-IR, permitiram verificar o potencial dessa ferramenta para o diagnóstico precoce de TEA. Embora os resultados da análise da concentração da lactoferrina salivar não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, a análise pela Espectroscopia FT-IR permitiu observar diferenças entre os grupos com base em diferenças nas sub-bandas e nos valores de área das gaussianas.

A análise da saliva por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) utilizou a segunda derivada, que é, por definição, a taxa de variação da inclinação, o que representa a curvatura do espectro (BACHIR; HAMADAH, 2021). Essa análise teve por finalidade melhorar a visualização das bandas de absorção, principalmente para bandas largas e sobrepostas, reduzindo a interferência de fundo e aumentando a precisão da análise para, assim, revelar as características bioquímicas genuínas da amostra (FERREIRA *et al.*, 2020; CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015). Esse processo facilitou a identificação e quantificação de todas as sub-bandas que formam o espectro infravermelho médio da saliva de ambos os grupos.

Para maior identificação dos modos vibracionais, que constituem as amostras de saliva presentes nos espectros experimentais de FT-IR, foi feita a deconvolução das bandas de absorção. A partir desse ajuste gaussiano, foi possível obter a área relativa de cada banda e, assim, descobrir quais delas apresentam maiores contribuições na composição da saliva.

No caso da Espectroscopia FT-IR, ressalta-se que as amostras de saliva analisadas neste estudo foram centrifugadas, permitindo a formação de precipitado e sobrenadante. Estudos anteriores demonstraram que o uso do sobrenadante é preferível, uma vez que apresenta menor probabilidade da presença de resíduos alimentares decorrentes de possíveis deficiências na higienização da cavidade bucal que podem alterar o resultado da análise (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015; NGOUNOU WETIE *et al.*, 2015a).

De acordo com Schultz *et al.* (1996), o espectro da saliva humana é bastante complexo porque a saliva é composta por diferentes componentes que apresentam bandas de absorção na região do infravermelho. Entretanto, Khaustova *et al.* (2010) demonstraram a existência de bandas específicas no infravermelho para alguns

componentes bioquímicos. De acordo com isso, no presente trabalho foi observado, ao longo dos espectros médios, diversas bandas de absorção que correspondem a grupos químicos relacionados a proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e carboidratos. A partir da deconvolução das bandas dos espectros médios, observaram-se alterações em regiões distintas nos grupos A e N.

Nos indivíduos com diagnóstico de TEA, as cinco bandas encontradas foram: 1521 cm^{-1} , relacionada à presença da banda tirosina, estiramento das ligações C-N e C-C e deformação angular da ligação N-H, característica de amida II de estruturas α -hélice de proteínas e aminoácidos; 1570 cm^{-1} , associada ao estiramento assimétrico do radical carboxil, observado no ácido láctico, além de estiramento das ligações do anel C-C do fenil e da amida II de proteínas. (BEL'SKAYA; SARF, 2021; FORATO *et al.*, 2010; KHAUSTOVA *et al.*, 2010; RIZZATO, 2019; SILVA, 2017a).

A banda 1599 cm^{-1} também está relacionada à amida II de estruturas α -hélice de proteínas e aminoácidos. A banda 1684 cm^{-1} corresponde aos modos vibracionais de estiramento da ligação C=O e deformação angular da ligação N-H de amida I de estruturas de folhas β -pregueadas de proteínas já citadas anteriormente. Por sua vez, a banda 1735 cm^{-1} apresentou alterações no modo vibracional de lipídios (como colesterol), fosfolipídios e ésteres de ácidos graxos (como mono/diglicerídeos), pelo estiramento da ligação C=O dessas moléculas. (BEL'SKAYA; SARF, 2021; FORATO *et al.*, 2010; KHAUSTOVA *et al.*, 2010; RIZZATO, 2019; SILVA, 2017a).

As três bandas detectadas unicamente nos indivíduos neurotípicos foram: 1493 cm^{-1} , que apresentam alterações nos modos vibracionais de proteínas pelo estiramento das ligações C-C e deformação angular das ligações C-H; 1515 cm^{-1} , cujas alterações são semelhantes às descritas para a banda 1521 cm^{-1} . A mesma similaridade de modos vibracionais se observa na banda 1582 cm^{-1} , em relação a banda 1570 cm^{-1} (BEL'SKAYA; SARF, 2021; FORATO *et al.*, 2010; KHAUSTOVA *et al.*, 2010; RIZZATO, 2019; SILVA, 2017a).

Outra diferença pode ser observada nos valores das áreas das gaussianas, obtidas pela deconvolução das bandas, que podem estar relacionadas ao aumento do volume de determinadas moléculas na saliva. É normal que os dois grupos tenham a mesma composição, porém com variações na intensidade de cada componente. Logo, os dois grupos devem apresentar bandas semelhantes com diferenças na área.

A técnica de Espectroscopia FT-IR apresenta bandas em determinadas regiões que têm sobreposição, como exemplo, regiões de diferentes proteínas com o mesmo

modo vibracional (SANTOS, 2011). Dessa forma, o resultado obtido dessa análise representa uma assinatura geral da amostra, que permite caracterizá-la. No entanto, alterações fisiológicas e psicológicas, período da coleta e jejum, entre outros, podem influenciar na constituição da saliva. (FERREIRA *et al.*, 2020; CAETANO JÚNIOR, 2016; MIURA, 2017; RIZZATO, 2019).

É possível sugerir que a condição de TEA esteja relacionada ao aumento de 4,41% da área da banda 1667 cm^{-1} no grupo A, relacionada ao estiramento das ligações C=O e C-N e deformação angular da ligação N-H, característica da amida I de estruturas α -hélice e de folhas β -pregueadas de proteínas. Também é possível observar no grupo N, em relação ao grupo A, um aumento de 4,85% da área da banda 1543 cm^{-1} , correspondente à amida II de proteínas e peptídeos, e de 7,94% da área da banda 1637 cm^{-1} , associada à amida I de estruturas de folhas β -pregueadas de proteínas (BEL'SKAYA; SARF, 2021; FORATO *et al.*, 2010; KHAUSTOVA *et al.*, 2010; RIZZATO, 2019; SILVA, 2017a).

A análise de deconvolução de bandas aplicada aos espectros coletados revelou regiões específicas, de proteína e lipídeos, que permitem diferenciar os grupos estudados. Entre as proteínas presentes na saliva, destacam-se a α -amilase, Mucinas, Lactoferrina, Imunoglobulinas, especialmente a Imunoglobulina A (sIgA), Albumina, Histatinas, Cistatinas, Estaterina, Lisozimas, Proteínas ricas em Prolina e Proteínas ricas em Tirosina (ALVES; SEVERI, 2016; ARCHETTI, 2014; CAETANO JÚNIOR, 2016; OSÓRIO *et al.*, 2000). Entretanto, não é possível especificar as proteínas alteradas pela análise vibracional. Para tanto, sugere-se, como passo complementar, realizar análise proteômica e/ou espectroscopia de massa.

Estudos anteriores constataram que perturbações no sistema nervoso central, comum em indivíduos autistas, que apresentam níveis de ansiedade e estresse aumentados e, frequentemente, fazem uso de medicamento que atuam diretamente sobre esse sistema, como ansiolíticos e antipsicóticos, induzem diminuição da atividade parassimpática, responsável pela secreção de líquidos e sais na saliva, e aumento significativo da atividade do sistema nervoso simpático, que diminui a taxa de fluxo salivar e torna essa amostra rica em proteínas, especialmente α -amilase, sódio, potássio e cortisol (ALMEIDA *et al.*, 2008b; BHATTARAI; KIM; CHAE, 2018; CARVALHO *et al.*, 2018; GHOLAMI *et al.*, 2017; KIM; SUH, 2001; LEMES *et al.*, 2016; PUTNAM *et al.*, 2012).

A alteração na concentração de proteínas salivares em indivíduos com TEA foi observada em diversos estudos, sugerindo o seu uso como biomarcador diagnóstico para TEA (SHEN *et al.*, 2020). Ngounou Wetie *et al.* (2015a; 2015b) relataram alteração em proteínas salivares envolvidas no sistema imunológico e inflamatório em indivíduos diagnosticados com TEA, observando aumento de proteína induzível de Prolactina, Integrina alfa-6, Anexina A1, Lactotransferrina, Lipocalina-1, Mucina-16, Proteínas secretadas pela parótida, entre outras. Porém, em contradição com outros estudos, foi relatada diminuição de α -amilase. Os autores apresentaram, também diminuição de Cistatina D, Plasminogênio, Zinco-alfa2-glicoproteína, entre outras (NGOUNOU WETIE *et al.*, 2015b; 2015a).

A diminuição dos fosfopeptídeos salivares Histatina-1, Estaterina, Fosfoproteína rica em prolina ácida também foram relatados (CASTAGNOLA *et al.*, 2008; NGOUNOU WETIE *et al.*, 2015a). Os estudos de Hewitson *et al.* (2021) e Yao *et al.* (2021), por meio de métodos de computacionais e validação experimentais, encontraram, respectivamente, três proteínas (SLC25A12, LIMK1 e RARS) e um painel com nove proteínas alteradas no sangue de indivíduos autistas, com alta sensibilidade e especificidade, apresentando amplo potencial como biomarcador para diagnóstico e identificação da patogênese de TEA.

Em virtude do ineditismo do estudo, não foi possível estabelecer correlação dos resultados obtidos nessa pesquisa com trabalhos que utilizaram a saliva e a Espectroscopia FT-IR, visto que não há correspondências com nosso objetivo de diagnóstico de TEA.

Os métodos de diagnóstico de TEA disponíveis têm suas limitações quanto rapidez e eficiência, uma vez que são baseados em interpretações subjetivas observacionais. Os resultados preliminares do presente estudo apontam a possibilidade de utilização da Espectroscopia FT-IR como ferramenta para diagnóstico do Transtorno do Espectro Autista.

Um longo caminho ainda deve ser percorrido, que compreende aumento no número de amostra, análises complementares citadas anteriormente, além da elaboração de um painel diagnóstico de componentes moleculares que possam servir como biomarcadores. Dessa forma, seria possível associar o atual diagnóstico clínico observacional a parâmetros clínicos quantificáveis, permitindo a aplicação desses instrumentos na área clínica, para o diagnóstico precoce, a pronta instituição de

tratamento e a integração desse indivíduo à sociedade, proporcionando a ele melhor qualidade de vida.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que a Espectroscopia FT-IR é uma ferramenta promissora para o diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista em amostras de saliva, permitindo identificar, fácil e rapidamente, alterações na composição desse fluido, principalmente de proteínas, entre indivíduos diagnosticados com TEA e neurotípicos, que poderiam servir como biomarcadores objetivos, eficazes e específicos para diagnóstico precoce desse transtorno.

No entanto, não foi possível correlacionar os resultados das análises de saliva por Espectroscopia FT-IR com as concentrações de Lactoferrina por ELISA.

Com relação aos subgrupos do TEA, foi possível observar o predomínio do sexo masculino, idade materna avançada, partos prematuros e doenças pré-natais. Entretanto, nenhum fator individual nos períodos pré-natal e perinatal foi consistentemente validado como fator de risco para o autismo.

REFERÊNCIAS

- ABDULHUSEIN, M. A. **Immunological and physiological changes in salivary sample of children with Autism Spectrum Disorder**. 2017. Tese (Doutorado em Fisiologia Oral) - Faculdade de Odontologia, Universidade de Bagdá, Bagdá, 2017.
- AFFOO, R. H. *et al.* Meta-analysis of salivary flow rates in young and older adults. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 63, n. 10, p. 2142–2151, 2015.
- AGUIAR, J. C. **Caracterização das espécies de *leishmania* e *trypanosoma* por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier**. 2016. Tese (Doutorado em Física e Astronomia) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, 2016.
- AHMED, S. S. S. J. *et al.* Studies On The Spectral Lines of Salivary Samples Taken From Smokers And Non-Smokers. **International Journal of Health**, v. 10, n. 2, 2010.
- AL-GADANI, Y. *et al.* Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 10–11, p. 1032–1040, 2009.
- AL-MAMARI, W. *et al.* Parental Age and the Risk of Autism Spectrum Disorder in Oman: A case-control study. **Clinical and Basic Research**, v. 21, n. 3, p. 465–471, 2021.
- ALMEIDA, P. D. V. DE *et al.* Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 9, n. 3, p. 72–80, 2008a.
- ALMEIDA, P. D. V. DE *et al.* Effects of antidepressants and benzodiazepines on stimulated salivary flow rate and biochemistry composition of the saliva. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 106, n. 1, p. 58–65, 2008b.
- ALMEIDA, S. S. DE A. *et al.* Transtorno Do Espectro Autista. **Residência Pediátrica**, v. 8, suppl. 1, p. 72–78, 2018.
- ALMEIDA, H. H. P.; LIMA, J. P. DE; BARROS, K. B. N. T. Cuidado Farmacêutico às crianças com Transtorno do Espectro Autista (TEA): Contribuições e desafios. **Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica (EEDIC)**, v.5, n.1, 2018.
- ALMSTÅHL, A.; WIKSTRÖM, M.; GROENINK, J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, n. 6, p. 345–352, 2001.
- AALTO SCIENTIFIC. **Alpha-Amylase**, 2022. Disponível em: <https://www.aaltoscientific.com/product/amylase/>. Acesso em: 5 fev. 2022.
- ALVES, K. T.; SEVERI, L. S. P. Componentes salivares associados à prevenção da cárie dental – revisão de literatura. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 37-42, 2016.

ALVES, L. E.; MONTEIRO, B. M. M.; SOUZA, J. C. Comparação da classificação dos transtornos do desenvolvimento infantil por meio do DSM-5, CID-10 e CID-11. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e6579109058-, 2020.

ALZGHOUL, L. *et al.* The association between levels of inflammatory markers in autistic children compared to their unaffected siblings and unrelated healthy controls. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 1047–1053, 2019.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5)**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ANDERSON, G. M. Autism Biomarkers: Challenges, Pitfalls and Possibilities. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, n. 4, p. 1103–1113, 2015.

ANTICORPOS - Funções Biológicas. **Livrozilla**, 2022. Disponível em: <https://livrozilla.com/doc/69971/anticorpos>. Acesso em: 5 fev. 2022.

ARCHETTI, F. B. **Interferência dos sucos de uva integral e reconstituído na estrutura das proteínas salivares e da película dental adquirida do esmalte**. 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ASSUMPÇÃO JUNIOR, F.; KUCZYNSKI, E. Psicofarmacoterapia nos transtornos globais do desenvolvimento. *In*: SCHWARTZMAN, J. S.; ARAÚJO, C. A. **Transtornos do Espectro do Autismo**. São Paulo: Memmon, 2011. p. 215-226.

AUTISM SPEAKS. **Autism and Health: Advances in understanding and treating the health conditions that frequently accompany autism**. [s.l.: s.n.], 2017.

BACHIR, W.; HAMADAH, O. Second derivative diffuse reflectance spectroscopy for estimating tissue hypoxia. **OSA Continuum**, v. 4, n. 2, p. 650–664, 2021.

BAKKER-HUVENAARS, M. J. *et al.* Saliva oxytocin, cortisol, and testosterone levels in adolescent boys with autism spectrum disorder, oppositional defiant disorder/conduct disorder and typically developing individuals. **European Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 87–101, 2018.

BANHARA, V. F. **Análise das alterações biomoleculares causadas pelo fármaco diclofenaco sódico em peixes de espécie *Brycon opalinus* através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2016.

BARGIELA, S.; STEWARD, R.; MANDY, W. The Experiences of Late-diagnosed Women with Autism Spectrum Conditions: An Investigation of the Female Autism Phenotype. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 46, n. 10, p. 3281–3294, 2016.

BEL'SKAYA, L. V.; SARF, E. A. Biochemical composition and characteristics of salivary FTIR spectra: Correlation analysis. **Journal of Molecular Liquids**, v. 341, p. 117380, 2021.

BEL'SKAYA, L. V.; SARF, E. A.; MAKAROVA, N. A. Use of Fourier Transform IR Spectroscopy for the Study of Saliva Composition. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 85, n. 3, p. 445–451, 2018.

BEL'SKAYA, L. V.; SARF, E. A.; KOSENOK, V. K. Age and gender characteristics of the biochemical composition of saliva: Correlations with the composition of blood plasma. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 10, n. 2, p. 59–65, 2020.

BEL'SKAYA, L. V.; SARF, E. A.; SOLOMATIN, D. V. Age and Gender Characteristics of the Infrared Spectra of Normal Human Saliva. **Applied Spectroscopy**, v. 74, n. 5, p. 536–543, 2020.

BENETTI, C. **Estudo da reparação óssea por espectroscopia ATR-FTIR após remoção de fragmento da região mandibular com laser de Er,Cr:YSGG ou broca multilaminada**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis Research**, v. 101, n. 2, p. 157–170, 2009.

BHATTARAI, K. R.; KIM, H. R.; CHAE, H. J. Compliance with saliva collection protocol in healthy volunteers: Strategies for managing risk and errors. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 8, p. 823–831, 2018.

BHUIYAN, L. C. A. P. *et al.* “ Study of Psychiatric Co - morbidity in Autism Spectrum Disorder ”. **Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 205–213, 2021.

BJØRKLUND, G. *et al.* Diagnostic and Severity-Tracking Biomarkers for Autism Spectrum Disorder. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 66, n. 4, p. 492–511, 2018.

BJØRKLUND, G. *et al.* Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2314–2332, 2020.

BORIS, M. *et al.* Effect of pioglitazone treatment on behavioral symptoms in autistic children. **Journal of Neuroinflammation**, v. 4, n. 3, p. 1–7, 2007.

BOROUMAND, M. *et al.* Saliva, a bodily fluid with recognized and potential diagnostic applications. **Journal of Separation Science**, n. July, p. 1–14, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Diretrizes de Atenção à Reabilitação da Pessoa com Transtornos do Espectro do Autismo (TEA)**. Brasília, 2014.

BRENTANI, H. *et al.* Autism spectrum disorders: An overview on diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, suppl. 1, p. S62–S72, 2013.

BUCHMAYER, S. *et al.* Can association between preterm birth and autism be explained by maternal or neonatal morbidity? **Pediatrics**, v. 124, n. 5, p. e817–e825,

2009.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BUEMO, B. *et al.* Autismo no Contexto Escolar: A Importância da Inserção Social. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 3, p. 01–13, 2019.

CAETANO JÚNIOR, P. C. C.; STRIXINO, J. F.; RANIERO, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. **Research on Biomedical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 116–124, 2015.

CAETANO JÚNIOR, P. C.; CASTILHO, M. L.; RANIERO, L. Salivary Cortisol Responses and Session Ratings of Perceived Exertion to a Rugby Match and Fatigue Test. **Perceptual and Motor Skills**, v. 124, n. 3, p. 649–661, 2017.

CAETANO JÚNIOR, P. C. **Análise do cortisol e imunoglobulina A salivares por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) em atletas**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2016.

CAI, J. *et al.* Elevated plasma levels of glutamate in children with autism spectrum disorders. **NeuroReport**, v. 27, n. 4, p. 272–276, 2016.

CARTER, A. S. *et al.* Sex differences in toddlers with autism spectrum disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 37, n. 1, p. 86–97, 2007.

CARVALHO, F. A. *et al.* Rastreamento de sinais precoces de transtorno do espectro do autismo em crianças de creches de um município de São Paulo. **Psicologia: Teoria e Prática**, v. 15, n. 2, p. 144–154, 2013.

CARVALHO, L. M. *et al.* Analysis of saliva composition in patients with burning mouth syndrome (BMS) by FTIR spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 100, p. 195–201, 2018.

CASTAGNOLA, M. *et al.* Hypo-Phosphorylation of Salivary Peptidome as Indicator of Molecular Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders. **Comprehensive Guide to Autism**, v. 7, n. 12, p. 5327–5332, 2008.

CHAUHAN, A.; CHAUHAN, V. Oxidative stress in autism. **Pathophysiology**, v. 13, n. 3, p. 171–181, 2006.

CHIAPPIN, S. *et al.* Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, n. 1–2, p. 30–40, 2007.

COHEN, M.; KHALAILA, R. Saliva pH as a biomarker of exam stress and a predictor of exam performance. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 77, n. 5, p. 420–425, 2014.

COHLY, H. H. P.; PANJA, A. Immunological Findings in Autism. **International Review of Neurobiology**, v. 71, p. 317–341, 2005.

CORTELAZZO, A. *et al.* Expression and oxidative modifications of plasma proteins in

autism spectrum disorders: interplay between inflammatory response and lipid peroxidation. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 10, n. 11, p. 1103–1112, 2016.

COSTA, G. DE O. N.; ABREU, C. R. DE C. Os benefícios do uso de psicofármacos no tratamento de indivíduos com Transtorno Do Espectro Autista (TEA): Revisão bibliográfica. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 4, n. 8, p. 240–251, 2021.

CROONENBERGHS, J. *et al.* Serum testosterone concentration in male autistic youngsters. **Activitas Nervosa Superior Rediviva**, v. 52, n. 2, p. 163–168, 2010.

CUNHA, D. A. da S. *et al.* Aplicações de espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR) para caracterização de complexos. *In*: ENCONTRO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEMS E UFGD (ENEPEX), 6., 2014, Mato Grosso do Sul. **Anais do ENIC**. Mato Grosso do Sul: UEMS, 2014. Disponível em: <https://anaisonline.uems.br/index.php/enic/article/view/2259/2183>. Acesso em: 10 out. 2021.

DAWES, C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. **The Journal of Physiology**, v. 220, n. 3, p. 529–545, 1972.

DAWES, C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. **Journal of the American Dental Association**, v. 139, suppl. 5, p. 18S-24S, 2008.

DAWES, C. *et al.* The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 6, p. 863–874, 2015.

DE MAGISTRIS, L. *et al.* Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 418–424, 2010.

DERRUAU, S. *et al.* Vibrational spectroscopy saliva profiling as biometric tool for disease diagnostics: A systematic literature. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 1–27, 2020.

DHOSSCHE, D. *et al.* Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: Stimulus for a GABA hypothesis of autism. **Medical Science Monitor**, v. 8, n. 8, p. 1–7, 2002.

EDGAR, M.; DAWES, C.; O'MULLANE, D. **Saliva and oral health**. 4. ed. London: Stephen Hancocks Limited, 2012.

EL-ANSARY, A.; AL-AYADHI, L. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2014.

ELDEVIK, S. *et al.* Meta-analysis of Early Intensive Behavioral Intervention for children with autism. **Journal of Clinical Child and Adolescent Psychology**, v. 38, n. 3, p. 439–450, 2009.

ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: Biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 131, n. 8, p. 875–885, 2006.

ESSER, D. *et al.* Sample stability and protein composition of saliva: Implications for its use as a diagnostic fluid. **Biomarker Insights**, v. 3, p. 25–37, 2008.

FARINHA, F. I. **A saliva como meio diagnóstico**. 2015. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, 2015.

FAUSTINO, N. F. R. **Análise filogenética de péptidos salivares**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2011.

FERNANDES, L. *et al.* Perfil do uso de Medicamentos em Pacientes Autistas Acompanhados na APAE de um Município do Interior da Bahia. **Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, v. 11, n. 35, p. 301–316, 2017.

FERREIRA, I. C. C. *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. **Journal of Oncology**, v. 2020, 2020.

FEZER, G. F. *et al.* Perinatal features of children with autism spectrum disorder. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 35, n. 2, p. 130–135, 2017.

FONSECA, M. S. M. *et al.* Malformação de Dandy-Walker. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 19, n. 1, p. 4–5, 2017.

FORATO, L. A. *et al.* A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**. São Carlos, 2010.

FRAZIER, T. W. *et al.* Behavioral and cognitive characteristics of females and males with autism in the simons simplex collection. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 53, n. 3, p. 329-340.e3, 2014.

FRUSTACI, A. *et al.* Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 10, p. 2128–2141, 2012.

FRYE, R. E. *et al.* Redox metabolism abnormalities in autistic children associated with mitochondrial disease. **Translational Psychiatry**, v. 3, p. e273, 2013.

FRYE, R. E. *et al.* Emerging biomarkers in autism spectrum disorder: a systematic review. **Annals of Translational Medicine**, v. 7, n. 23, p. 792, 2019.

Função orgânica: Amida. **Hidrocarbonetos**, 2022. Disponível em: <https://vicsato.wixsite.com/hidrocarbonetos/single-post/2015/11/09/fun%C3%A7%C3%A3o-org%C3%A2nica-amida>. Acesso em: 5 fev. 2022.

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 83–94, 2004.

GADIENT, R. A.; OTTEN, U. H. Interleukin-6 (IL-6) - A molecule with both beneficial

and destructive potentials. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 5, p. 379–390, 1997.

GALIANA-SIMAL, A. *et al.* Towards a future molecular diagnosis of autism: Recent advances in biomarkers research from saliva samples. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 67, p. 1–5, 2018.

GARDENER, H.; SPIEGELMAN, D.; BUKA, S. L. Perinatal and neonatal risk factors for autism: A comprehensive meta-analysis. **Pediatrics**, v. 128, n. 2, p. 344–355, 2011.

GEIER, D. A. *et al.* A prospective study of transsulfuration biomarkers in autistic disorders. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 2, p. 386–393, 2009.

GHALEIHA, A. *et al.* A pilot double-blind placebo-controlled trial of pioglitazone as adjunctive treatment to risperidone: Effects on aberrant behavior in children with autism. **Psychiatry Research**, v. 229, n. 1–2, p. 181–187, 2015.

GHANIZADEH, A. *et al.* Glutathione-Related Factors and Oxidative Stress in Autism, A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 23, p. 4000–4005, 2012.

GHOLAMI, N. *et al.* Effect of stress, anxiety and depression on unstimulated salivary flow rate and xerostomia. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 11, n. 4, p. 247–252, 2017.

GLASSON, E. J. *et al.* Journal of Autism and Developmental Disorders: A Population Study. **Archives Of General Psychiatry**, v. 61, n. 6, p. 618–627, 2004.

GLIMVALL, P.; WICKSTRÖM, C.; JANSSON, H. Elevated levels of salivary lactoferrin, a marker for chronic periodontitis? **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 5, p. 655–660, 2012.

GOLDANI, A. A. S. *et al.* Biomarkers in autism. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, n.100, p. 1-13, 2014.

GRUOL, D. L.; NELSON, T. E. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, v. 15, n. 3, p. 307–339, 1997.

GUINCHAT, V. *et al.* Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 91, n. 3, p. 287–300, 2012a.

GUINCHAT, V. *et al.* Very early signs of autism reported by parents include many concerns not specific to autism criteria. **Research in Autism Spectrum Disorders**, v. 6, n. 2, p. 589–601, 2012b.

GUEDES, N. P. DA S.; TADA, I. N. C. A produção científica brasileira sobre autismo na psicologia e na educação. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 31, n. 3, p. 303–309, 2015.

HAACK, M. de S. **Análise de materiais por espectroscopia no infravermelho dentro do sistema de gestão de qualidade conforme ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 2010. Monografia (Graduação em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HADJKACEM, I. *et al.* Prenatal, perinatal and postnatal factors associated with autism spectrum disorder. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 92, n. 6, p. 595–601, 2016.

HAGLUND, N. G. S.; KÄLLÉN, K. B. M. Risk factors for autism and Asperger syndrome: Perinatal factors and migration. **Autism**, v. 15, n. 2, p. 163–183, 2011.

HARTLEY, S. L.; SIKORA, D. M. Sex differences in Autism spectrum disorder: An examination of developmental functioning, Autistic symptoms, and coexisting behavior problems in toddlers. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 39, n. 12, p. 1715–1722, 2009.

HASHEM, S. *et al.* Genetics of structural and functional brain changes in autism spectrum disorder. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 229, p. 1-17, 2020.

HEWITSON, L. *et al.* Blood biomarker discovery for autism spectrum disorder: A proteomic analysis. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2, p. 1–15, 2021.

HODGES, H.; FEALKO, C.; SOARES, N. Autism spectrum disorder: Definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. **Translational Pediatrics**, v. 9, n. 8, p. S55–S65, 2020.

HOMERCHER, B. M. *et al.* Observação Materna: Primeiros Sinais do Transtorno do Espectro Autista Maternal. **Estudos e Pesquisas em Psicologia**, v. 20, n. 2, p. 540–558, 2020.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent.**, v. 85, n. 2, p. 162–169, 2001.

HYMAN, S. L.; LEVY, S. E.; MYERS, S. M. Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. **Pediatrics**, v. 145, n. 1, 2020.

JACK, A. *et al.* A neurogenetic analysis of female autism. **Brain: a journal of neurology**, v. 144, n. 6, p. 1911–1926, 2021.

JENKINS, F. A.; WHITE, H. E. **Fundamentals of Optics**. 4. ed. [s.l.]: McGraw-Hill Higher Education, 2001.

JOHNSON, C. P. *et al.* Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v. 120, n. 5, p. 1183–1215, 2007.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. The diagnostic applications of saliva - A review. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, n. 2, p. 197–212, 2002.

KERN, J. K.; JONES, A. M. Evidence of toxicity, oxidative stress, and neuronal insult in autism. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 9, n. 6, p. 485–499, 2006.

KHAUSTOVA, S. *et al.* Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst**, v. 135, n. 12, p. 3183–3192, 2010.

KHAUSTOVA, S. A. *et al.* Assessment of biochemical characteristics of the saliva using fourier transform mid-infrared spectroscopy. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 148, n. 5, p. 841–844, 2009.

KHEMAKHEM, A. M. *et al.* Novel biomarkers of metabolic dysfunction in autism spectrum disorder: potential for biological diagnostic markers. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 6, p. 1983–1997, 2017.

KIM, H.-J.; SUH, B.-J. Changes in Salivary Flow Rate and pH in Stressful Conditions. **Journal of the Korean Academy of Oral Medicine**, v. 6, n. 1, p.11-16, 2001.

KOHARA, E. K. **Estudo proteômico da saliva de adolescentes acometidos de lesões de cárie ativas em diferentes estágios de severidade**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

KUŁAK-BEJDA, A. *et al.* Diagnostic value of salivary markers in neuropsychiatric disorders. **Disease Markers**, v. 2019, 2019.

KUSHAK, R. I. *et al.* Evaluation of intestinal function in children with autism and gastrointestinal symptoms. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 62, n. 5, p. 687–691, 2016.

KUZNIEWICZ, M. W. *et al.* Prevalence and neonatal factors associated with autism spectrum disorders in preterm infants. **Journal of Pediatrics**, v. 164, n. 1, p. 20–25, 2014.

LAMPI, K. M. *et al.* Risk of autism spectrum disorders in low birth weight and small for gestational age infants. **Journal of Pediatrics**, v. 161, n. 5, p. 830–836, 2012.

LAWRENCE, H. P. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. **Journal (Canadian Dental Association)**, v. 68, n. 3, p. 170–174, 2002.

LEE, B. K. *et al.* Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. **Brain, behavior, and immunity**, v. 44, p. 100–105, 2015.

LEITE, R.; MEIRELLES, L.; MILHOMEM, D. Medicamentos usados no tratamento psicoterapêutico de crianças autistas em Teresina – PI . Drugs used in the psychotherapeutic treatment of autistic children in. **Boletim Informativo Geum**, v. 6, n. 3, p. 91–97, 2015.

LEMES, L. C. *et al.* Analysis of serum cortisol levels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for diagnosis of stress in athletes. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, v. 32, n. 3, p. 293–300, 2016.

LI, X. *et al.* Identification of colitis and cancer in colon biopsies by fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

LIMA, D. P. *et al.* Saliva: reflection of the body. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 184–188, 2010.

LIMA, V. *et al.* Fisiologia das Secreções Salivares e Gastrointestinais. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. de C. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 479–522.

LOOMES, R.; HULL, L.; MANDY, W. P. L. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 56, n. 6, p. 466–474, 2017.

LOPES, J. *et al.* FTIR and Raman Spectroscopy Applied to Dementia Diagnosis Through Analysis of Biological Fluids. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 52, n. 3, p. 801–812, 2016.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.

LOPEZ-JORNET, P. *et al.* Salivary Biomarkers and Their Correlation with Pain and Stress in Patients with Burning Mouth Syndrome. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 929, 2020.

LORD, C. *et al.* Autism spectrum disorder. **The Lancet**, v. 392, n. 10146, p. 508–520, 2018.

LORD, C. *et al.* Autism spectrum disorder. **Nature reviews Disease primers**, v. 6, n. 1, p. 5, 2020.

LORD, C.; SCHOPLER, E.; REVICKI, D. Sex differences in autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 12, n. 4, p. 317–330, 1982.

LYALL, K. *et al.* The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. **Annual Review of Public Health**, v. 38, p. 81–102, 2017.

MAENNER, M. 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 Surveillance Summaries**, v. 69, n. 4, p. 1–12, 2020.

MADASCHI, V. **Autismo: Fatores relacionados a idade de diagnóstico**. 2021. 73f. Tese (Doutorado em Distúrbios do Desenvolvimento) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2021.

MALAMUD, D. Saliva as a Diagnostic Fluid. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 159–178, 2011.

MANOHAR, H. *et al.* Early Diagnosis and Intervention for Autism Spectrum Disorder: Need for Pediatrician–Child Psychiatrist Liaison. **Indian Journal of Psychological Medicine**, v. 41, n. 1, p. 87–90, 2019.

MARCHEZAM, J. **Transtorno do Espectro Autista e Neuroinflamação: Busca por Biomarcadores e Alvos Terapêuticos**. 2018. 255f. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MARCHEZAN, J. *et al.* Immunological dysfunction in autism spectrum disorder: A potential target for therapy. **NeuroImmunoModulation**, v. 25, n. 5–6, p. 300–319, 2019.

MARÍ, M. *et al.* Mitochondrial Glutathione: Features, regulation and role in disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3317–3328, 2013.

MARIN, E. P. **Espectroscopia de infravermelho e suas aplicações**. 2013. 73 f. Monografia (Graduação em Física) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

MARTIROSIAN, G. *et al.* Fecal lactoferrin and Clostridium spp. in stools of autistic children. **Anaerobe**, v. 17, n. 1, p. 43–45, 2011.

MIURA, F. L. **Alterações salivares em ratos após 5/6 nefrectomia**: Novos biomarcadores salivares para Doença Renal Crônica. 2017. 71f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MIZOBE-ONO, L.; ARAÚJO, J. L. P. DE; DOS-SANTOS, M. C. Componentes das imunidades inata e adaptativa presentes na saliva humana. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 4, p. 253–261, 2006.

MODAHL, C. *et al.* Plasma oxytocin levels in autistic children. **Biological Psychiatry**, v. 43, n. 4, p. 270–277, 1998.

MOLLOY, C.; MANNING, P. Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and. **Seage Journals**, v. 7, n. 2, p. 165–171, 2003.

MORALES-CHÁVEZ, M. C.; VILLARROEL-DORREGO, M.; SALAS, V. Salivary factors related to caries in children with autism. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 43, n. 1, p. 22–26, 2019.

MOTA, F. S. B. *et al.* A brief review of saliva biomarkers as a diagnostic tool for Autism Spectrum Disorder (ASD). **International Journal of Development Research**, v. 10, n. 11, p. 42409–42414, 2020.

MOURA, S. A. B. DE *et al.* Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 7, n. 2, p. 187–194, 2007.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134–179, 2008.

NAKANO, A. R.; BONAN, C.; TEIXEIRA, L. A. A normalização da cesárea como modo de nascer: cultura material do parto em maternidades privadas no Sudeste do Brasil. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 885–904, 2015.

NASCIMENTO, A. C. C.; LIMA, G. P. L.; MORAES, P. M. A. S. Intervenção precoce em crianças com suspeita ou diagnóstico de autismo: uma revisão integrativa. **Centro**

Universitário UNA, 2021.

NASEER, K.; ALI, S.; QAZI, J. ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics: a systematic review of the approach using bio-fluids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 56, n. 2, p. 85–97, 2021.

NAUSHAD, S. M. *et al.* Autistic children exhibit distinct plasma amino acid profile. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 50, n. 5, p. 474–478, 2013.

NATER, U. M. *et al.* Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. **International Journal of Psychophysiology**, v. 55, n. 3, p. 333–342, 2005.

NGOUNOU WETIE, A. G. *et al.* A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Autism Research**, v. 8, n. 3, p. 338–350, 2015a.

NGOUNOU WETIE, A. G. *et al.* Comparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the salivary proteome of children with autism spectrum disorder. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 11, p. 2664–2678, 2015b.

NUNES, L. A. S.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. **European Psychologist**, v. 25, n. 2, p. 177–192, 2014.

OCHOA, T. J.; CLEARY, T. G. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 30–34, 2009.

OLIVEIRA, G. *et al.* Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A population-based study. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 47, n. 3, p. 185–189, 2005.

OLIVEIRA, N. B. **Utilização da espectroscopia no infravermelho (FT-IR) para a identificação de herbicida à base de diuron em plantas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, 2014.

OLSEN, I.; SINGHRAO, S. K. Low levels of salivary lactoferrin may affect oral dysbiosis and contribute to Alzheimer's disease: A hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 146, p. 110393, 2021.

ORNOY, A. *et al.* School-age Children Born to Diabetic Mothers and to Mothers with Gestational Diabetes Exhibit a High Rate of Inattention and Fine and Gross Motor Impairment. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 14, p. 681–689, 2001.

ORNOY, A.; LIZA, W. F.; ERGAZ, Z. Genetic syndromes, maternal diseases and antenatal factors associated with autism spectrum disorders (ASD). **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 1–21, 2016.

OSÓRIO, N. M. *et al.* Saliva e saúde oral. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 41, n. 4, p. 195–198, 2000.

OZONOFF, S. *et al.* A Prospective Study of the Emergence of Early Behavioral Signs of Autism. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 256- 266.e2, 2010.

PALMIERI, L.; PERSICO, A. M. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: Cause or effect? **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 6–7, p. 1130–1137, 2010.

PALUSZKIEWICZ, C. *et al.* Saliva as a first-line diagnostic tool: A spectral challenge for identification of cancer biomarkers. **Journal of Molecular Liquids**, v. 307, p. 112961, 2020.

PANDEY, V. *et al.* Saliva - A Diagnostic Fluid: A Review. **International Journal of Dental and Medical Research**, v. 1, n. 3, p. 149–154, 2014.

PASCHOTTO, D. R. *et al.* Saliva preparation method exploration for ATR-FTIR spectroscopy: Towards bio-fluid based disease diagnosis. **Analytical Sciences**, v. 36, n. 9, p. 1059–1064, 2020.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PEREIRA, A. M.; RIESGO, R. S.; WAGNER, M. B. Childhood autism: Translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 6, p. 487–494, 2008.

PI, X. *et al.* A meta-analysis of oral health status of children with autism. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 44, n. 1, p. 1–7, 2020.

PINTO, M. M. V. *et al.* Plasmatic and salivary biomarkers for early diagnosis of Autism Spectrum Disorder : a systematic review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e412101018924, 2021.

POLLAND, K. E.; HIGGINS, F.; ORCHARDSON, R. Salivary flow rate and pH during prolonged gum chewing in humans. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 30, n. 9, p. 861–865, 2003.

PÓLVORA, T. L. S. **Influência do tratamento periodontal não-cirúrgico na contagem oral de *Candida spp*, e nos níveis salivares de lactoferrina e histatina, em pacientes infectados pelo HIV-1 apresentando periodontite crônica.** 2018. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

POSSERUD, M. B. *et al.* Male to female ratios in autism spectrum disorders by age, intellectual disability and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 144, n. 6, p. 635–646, 2021.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information.** 2022a. Ammonia (222). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ammonia>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022b. D-Glucose (5793). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Glucose>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022c. Ergocalciferol (5280793). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ergocalciferol>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022d. Estradiol (5757). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estradiol>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022e. Hydrocortisone (5754). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrocortisone>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022f. Lactic acid (612). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-acid>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2021. Lactoferrin (322-329) (human). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactoferrin-322-329-human>. Acesso em: 4 out. 2021.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022. Phenylalanine (6140). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylalanine>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022. Progesterone (5994). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Progesterone>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022. Proline (145742). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Proline>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022. Testosterone (6013). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Testosterone>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022. Tyrosine (6057). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrosine>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUBCHEM COMPOUND. **National Center for Biotechnology Information**. 2022. Urea (1176). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Urea>. Acesso em: 5 fev. 2022.

PUTNAM, S. K. *et al.* Comparison of saliva collection methods in children with high-functioning Autism Spectrum disorders: Acceptability and recovery of cortisol. **Child Psychiatry and Human Development**, v. 43, n. 4, p. 560–573, 2012.

QUEIROZ, V. A. DE O.; ASSIS, A. M. O.; DA COSTA, H. R. Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrointestinal. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 31, n.

1, p. 90–95, 2013.

RATAJCZAK, H. V.; SOTHERN, R. B. Measurement in saliva from neurotypical adults of biomarkers pertinent to autism spectrum disorders. **Future Science OA**, v. 1, n. 4, 2015.

RENDA, R. Can salivary creatinine and urea levels be used to diagnose chronic kidney disease in children as accurately as serum creatinine and urea levels? A case-control study. **Renal Failure**, v. 39, n. 1, p. 452–457, 2017.

RICE, C. E. *et al.* Evaluating Changes in the Prevalence of the Autism Spectrum Disorders (ASDs). **Public Health Reviews**, v. 34, n. 2, 2012.

RIZZATO, J. M. B. **Estudo piloto sobre a caracterização da saliva de pacientes fumantes por Espectroscopia FT-IR**. 2019. 38 f. Monografia (graduação) - Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2019.

RODRIGUES, L. M. *et al.* Effect of smoking cessation in saliva compounds by FTIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 174, p. 124-129, 2017.

RODRIGUES, R. P. C. B. *et al.* Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR- FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. **Brazilian Dental Journal**, v. 30, n. 5, p. 437–445, 2019.

ROSSIGNOL, D. A.; FRYE, R. E. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 3, p. 290–314, 2012.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. São Paulo: Unesp, 1996. 223 p.

SANDIN, S. *et al.* Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: A review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 5, p. 477- 486.e1, 2012.

SANCHEZ-BRITO, M. *et al.* Type 2 diabetes diagnosis assisted by machine learning techniques through the analysis of FTIR spectra of saliva. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 69, p. 102855, 2021.

SÁNCHEZ-BRITO, M. *et al.* Saliva analysis using FTIR spectroscopy to detect possible SARS-CoV-2 (COVID-19) virus carriers. **Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica**, v. 42, n. 1, p. 6–9, 2021.

SANTOS, P. M. DOS. **Diferenciação de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida parapsilosis* através de microespectroscopia (FT-IR) e análise estatística multivariada**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, 2011.

SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. News in Biomarkers in Medicine. **Biomarkers in Medicine**, v. 2, n. 5, p. 441–443, 2008.

SCHULTZ, C. P. *et al.* Thiocyanate levels in human saliva: Quantitation by Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, v. 240, n. 1, p. 7–12, 1996.

SEREDIN, P. V. *et al.* Diagnostic potential of the oral fluid for the observation people with multiple dental caries by means of FTIR. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1124, n. 3, p. 031007, 2018.

SHEN, L. *et al.* Biomarkers in autism spectrum disorders: Current progress. **Clinica Chimica Acta**, v. 502, p. 41–54, 2020.

SILVA, A. R. **O uso da espectroscopia infravermelha (FT-IR) e análise estatística multivariada no estudo de venenos de serpentes**. 2011.1 disco laser. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do vale do Paraíba, São José dos Campos, 2011.

SILVA, C. O. DA *et al.* Benefícios no uso de intervenção precoce em crianças com transtorno do espectro autista (TEA): uma revisão integrativa. **Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents**, v. 9, n. 7, p. e256972474, 2020.

SILVA, G. A. S. da. **Desenvolvimento de nanopartículas para incremento do sinal de Espectroscopia FTIR salivar como fluido diagnóstico**. 2017. Monografia (Graduação em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017a.

SILVA, M. D. DA. **Análise de características orgânicas, pH e fluxo de saliva total não estimulada de recém nascido a termo**. 2017. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017b.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.

SLAMA, S. *et al.* Risk factors in autism spectrum disorder: A Tunisian case-control study. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2022.

SOLOMON, M. *et al.* Autism symptoms and internalizing psychopathology in girls and boys with autism spectrum disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 42, n. 1, p. 48–59, 2012.

SOUZA, N. C. S. *et al.* Intestinal permeability and nutritional status in developmental disorders. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 19–24, 2012.

STEIJNS, J. M.; VAN HOOIJDONK, A. C. M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **British Journal of Nutrition**, v. 84, suppl. 1, p. S11-S17, 2000.

STUART, B. H. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. 1. ed. England: John Wiley & Sons, Inc., 2004. 248 p.

TAKAI, N. *et al.* Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. **Archives of Oral Biology**, v. 49, n. 12, p. 963–968, 2004.

VALI, S. *et al.* Integrating glutathione metabolism and mitochondrial dysfunction with implications for Parkinson's disease: A dynamic model. **Neuroscience**, v. 149, n. 4, p. 917–930, 2007.

VAN DER STRATE, B. W. A. *et al.* Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Research**, v. 52, n. 3, p. 225–239, 2001.

VARCIN, K. J.; JESTE, S. S. The emergence of autism spectrum disorder: Insights gained from studies of brain and behaviour in high-risk infants. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 30, n. 2, p. 85–91, 2017.

VIDAL, A. M. B.; CATAPANI, W. R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: Advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 6, p. 282–285, 2005.

WEI, H. *et al.* IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 52, 2011.

WILSON, C. E. *et al.* Does sex influence the diagnostic evaluation of autism spectrum disorder in adults? **Autism**, v. 20, n. 7, p. 808–819, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO**. 2021. Autism spectrum disorders (ASD). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>. Acesso em: 10 out. 2021.

WU, K. P. *et al.* Relationship between unstimulated salivary flow rate and saliva composition of healthy children in Taiwan. **Chang Gung Medical Journal**, v. 31, n. 3, p. 281–286, 2007.

WU, S. *et al.* Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 135, n. 1, p. 29–41, 2016.

YANG, C. J. *et al.* The roles of cortisol and pro-inflammatory cytokines in assisting the diagnosis of autism spectrum disorder. **Research in Autism Spectrum Disorders**, v. 9, p. 174–181, 2015.

YAO, F. *et al.* Protein Biomarkers of Autism Spectrum Disorder Identified by Computational and Experimental Methods. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, n. 554621, p. 1–13, 2021.

YOSHIZAWA, J. M. *et al.* Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 781–791, 2013.

ZANON, R. B.; BACKES, B.; BOSA, C. A. Diagnóstico do autismo: relação entre fatores contextuais, familiares e da criança. **Psicologia - Teoria e Prática**, v. 19, n. 1, p. 152–163, 2017.

ZERBO, O. *et al.* Maternal Infection during Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, n. 12, p. 4015–4025, 2016.

ZHANG, C. Z. *et al.* Saliva in the diagnosis of diseases. **International Journal of Oral**

Science, v. 8, n. 3, p. 133–137, 2016a.

ZHANG, Y. *et al.* The emerging landscape of salivary diagnostics. **Periodontology** **2000**, v. 70, n. 1, p. 38–52, 2016b.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 8, p. 799–817, 2014.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Análise óptica da saliva de indivíduos diagnosticados com Síndrome do Espectro Autista.

Pesquisador Responsável: Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa

Equipe executora: Profa. Dra. Emilia Angela o Schiavo Arisawa (CPF: 834.052.838-68 e e-mail: mirela@univap.br); Prof. Dr. Leandro José Raniero (CPF: 911.281.969-72 e e-mail: Iraniero@univap.br); Mestranda Mayara Moniz Vieira Pinto (CPF: 446.515.858-09 e e-mail: mayara_moniz2007@hotmail.com).

Instituição/Departamento: Núcleo de Farmácia e Biomedicina da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Vale do Paraíba (UNIVAP)

Responsável legal: _____

R.G. Responsável legal: _____

A Sr.^{a(o)} está sendo convidado (a) a autorizar, como responsável, a participação voluntária em uma pesquisa tendo como título “Análise óptica da saliva de indivíduos diagnosticados com Espectro Autista”, de responsabilidade da pesquisadora Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa.

A saliva é um fluido biológico produzido por glândulas presentes na cavidade bucal e tem como função lubrificar as mucosas, auxiliar na digestão e facilitar a ingestão de alimentos. Dentre a ampla gama de funções que a saliva tem para as pessoas, a possibilidade de descobrir doenças tem sido muito importante nas últimas décadas. Comparada ao sangue, a saliva possui algumas vantagens, uma vez que pode ser coletada por procedimentos não invasivos, sem precisar de nenhum equipamento especial, e o diagnóstico por meio da análise da saliva para idosos e crianças é potencialmente importante uma vez que é associado a menores problemas ou complicações.

O objetivo deste estudo é analisar a composição da saliva pelo estudo dos componentes obtidos pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) em busca de alterações bioquímicas que possam auxiliar no diagnóstico precoce da Síndrome do Espectro Autista.

Para a coleta da saliva, será solicitado a todo o voluntário para se sentar confortavelmente. Será, então, realizada a limpeza da boca, utilizando água destilada. Em seguida, todos os indivíduos permanecerão sentados com a cabeça ligeiramente inclinada a frente e olhos abertos, sendo solicitado que evitem fazer movimentos com a boca ou o rosto, este procedimento pode causar algum desconforto, mas poderá ser minimizado pelo treinamento antecipado da equipe de coleta. A saliva não estimulada será coletada em tubo estéril de 2 ml e entregue ao pesquisador responsável pela coleta, o qual a transportará para o laboratório onde será utilizada de acordo com o objetivo do estudo.

Este estudo permitirá identificar um ou mais biomarcadores que possibilite o diagnóstico precoce da Síndrome do Espectro Autista, permitindo uma intervenção rápida e minimizando significativamente os sintomas.

Você será ressarcido com o valor igual ao da passagem do transporte público no dia da coleta. Garante-se que não haverá nenhum tipo de comercialização ou o uso da saliva com fins de obtenção de lucro, assim como para qualquer uso que não seja o desta pesquisa.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

Todos os dados pessoais relativos ao(a) Senhor(a) e/ou ao seu(a) filho(a) doador(a) voluntário(a) ou a saliva coletada, serão tratados em caráter estritamente científico, mantendo-se o segredo, garantindo-se o anonimato. Não haverá nenhuma remuneração, compensação material ou financeira ou privilégio pela doação da saliva. A sua doação é livre e voluntária e o(a) Senhor(a) pode recusar e/ou desistir da doação da saliva até o momento de sua coleta, sem que isto cause prejuízo ao seu atendimento e/ou ao do(a) seu filho(a).

O documento a ser assinado está em duas vias. Uma dela é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Para esclarecimento de eventuais dúvidas o(a) Senhor(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Emília Angela Lo Schiavo Arisawana, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, telefones (12) 3947-1015, (12) 99145-5100 e e-mail mirela@univap.br.

Este projeto está sendo submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, na Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova,

bloco 11- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento II, sala 19; telefone (12) 3947-1111, sendo o Comitê co-responsável por garantir e zelar pelos seus direitos.

Eu, _____, RG nº _____, responsável legal por _____, RG nº _____ fui informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

São José dos Campos, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura da paciente

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento (graduado no mínimo)

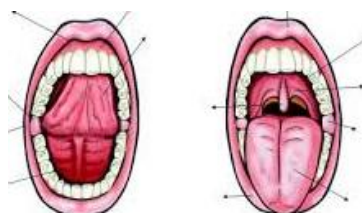
APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO

VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR DA PESQUISA: “**ANÁLISE ÓPTICA DA SALIVA DE INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**”.

SEUS PAIS DEIXARAM VOCÊ PARTICIPAR. VOCÊ NÃO PRECISA PARTICIPAR SE NÃO QUISER, É UM DIREITO SEU E NÃO HAVERÁ NENHUM PROBLEMA SE DESISTIR.

COM ESTA PESQUISA, QUEREMOS SABER SE A ANÁLISE ÓPTICA DA SALIVA É EFICAZ PARA O DIAGNÓSTICO DO AUTISMO.

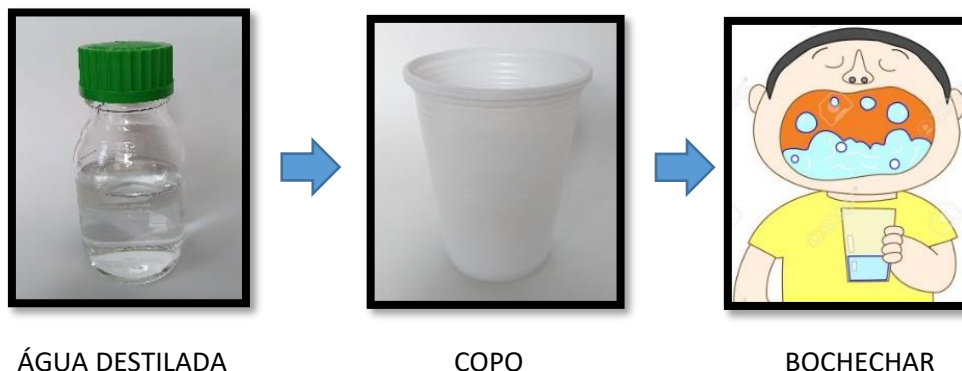
PRIMEIRO, A SUA BOCA SERÁ EXAMINADA.



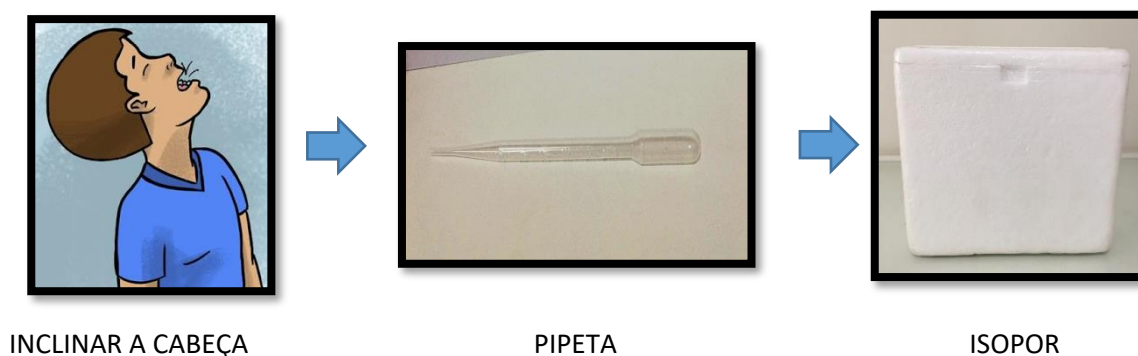
ELA NÃO PODE TER NENHUM MACHUCADO. NO DIA DA COLETA, POR DUAS HORAS ANTES DA COLETA DA SALIVA, VOCÊ NÃO PODERÁ ESCOVAR OS DENTES, E TAMBÉM COMER OU BEBER. MAS VOCÊ VAI PODER TOMAR ÁGUA SE TIVER VONTADE!



NÓS IREMOS LIMPAR A SUA BOCA COM UMA ÁGUA DIFERENTE, QUE SE CHAMA ÁGUA DESTILADA.



DEPOIS DE LIMPAR A BOCA, VOCÊ VAI TER QUE FICAR SENTADO COM A CABEÇA PARA CIMA SEM SE MEXER POR ALGUNS MINUTOS.



NÓS NOS COMPROMETEMOS A INFORMÁ-LO SOBRE OS RESULTADOS ENCONTRADOS E TAMBÉM A DIVULGÁ-LOS AMPLAMENTE, MANTENDO SIGILO DO NOME DOS PARTICIPANTES.

OUTRA INFORMAÇÃO IMPORTANTE É QUE NINGUÉM SABERÁ DE SUA PARTICIPAÇÃO NESTA PESQUISA: NÃO FALAREMOS A OUTRAS PESSOAS, NEM DAREMOS A PESSOAS CONHECIDAS SUAS AS INFORMAÇÕES QUE VOCÊ NOS DER.

SE VOCÊ AINDA TIVER ALGUMA DÚVIDA, VOCÊ PODE PERGUNTAR PARA A PESQUISADORA, EMÍLIA ÂNGELA LO SCHIAVO ARISAWA OU ENTRAR EM CONTATO COM O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

EU _____ ACEITO PARTICIPAR DA PESQUISA.

ENTENDI AS COISAS RUINS E AS COISAS BOAS QUE PODEM ACONTECER. ENTENDI QUE POSSO DIZER “SIM” E PARTICIPAR, MAS QUE, A QUALQUER MOMENTO, POSSO DIZER “NÃO” E DESISTIR E QUE NINGUÉM VAI FICAR CHATEADO.

OS PESQUISADORES LERAM PARA MIM, TIRARAM MINHAS DÚVIDAS E CONVERSARAM COM OS MEUS PAIS OU RESPONSÁVEIS. RECEBI UMA VIA DESTE TERMO DE ASSENTIMENTO E OUVI A LEITURA E CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA.

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, _____ DE _____ DE _____.



COLOQUE SEU DEDINHO AQUI

ASSINATURA DO PESQUISADOR

APÊNDICE C – QUESTIONÁRIOS PARA INDIVÍDUOS COM TEA**Parte I – Questões sobre quem está preenchendo este questionário:**

1 – Sua relação com a pessoa com autismo:

() Pessoa com autismo

() Pais

() Filhos

() Tios

() Avós

() Irmãos

() Cuidadores

() Outros: _____

Parte II – Questões sobre a pessoa portadora:

1 – Sexo: () Feminino () Masculino

2 – Idade: _____

3 – Data de nascimento: ____/____/____

4 – Cidade: _____

5 – Estado: _____

6 – Escolaridade: _____

7 – Com quem reside? _____

8 – Início dos sintomas:

() 0 – 6 meses

() 6 – 12 meses

() 12 – 18 meses

() 18 – 24 meses

() 24 – 30 meses

() 30 – 36 meses

() Acima de 36 meses

() Não sei

9 – Quais foram os sintomas?

10 – Idade do diagnóstico:

11 – Qual profissional deu o diagnóstico?

12 – Realiza intervenção? () Sim () Não

Se sim, com qual idade começou?

13 – Possui algum problema de saúde? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

14 – Faz uso de medicamento? () Sim () Não

Se sim, qual(ais) medicamento(s)? Há quanto tempo?

Parte III – Questões sobre a mãe e gestação/parto:

1 – Com qual idade engravidou?

2 – Tem algum problema de saúde? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

3 – Houve complicação durante a gestação? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

4 – Fez uso de medicamento durante a gestação? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

5 – Fez uso de bebidas alcoólicas e/ou drogas durante a gravidez? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

6 – Parto: () Cesariana () Normal

7 – Com quantas semanas o bebê nasceu?

APÊNDICE D – QUESTIONÁRIOS PARA INDIVÍDUOS NEUROTÍPICOS**Parte I – Questões sobre quem está preenchendo este questionário:**

1 – Sua relação com a pessoa com autismo:

() Pais

() Filhos

() Tios

() Avós

() Irmãos

() Cuidadores

() Outros: _____

Parte II – Questões individuais:

1 – Sexo: () Feminino () Masculino

2 – Idade: _____

3 – Data de nascimento: ____/____/____

4 – Cidade: _____

5 – Estado: _____

6 – Escolaridade: _____

7 – Com quem reside? _____

8 – Possui algum problema de saúde? () Sim () Não

Se sim, qual (ais)?

9 – Faz uso de medicamento? () Sim () Não

Se sim, qual(ais) medicamento(s)? Há quanto tempo?

Parte III – Questões sobre a mãe e gestação/parto:

1 – Com qual idade engravidou?

2 – Tem algum problema de saúde? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

3 – Houve complicação durante a gestação? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

4 – Fez uso de medicamento durante a gestação? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

5 – Fez uso de bebidas alcoólicas e/ou drogas durante a gravidez? () Sim () Não

Se sim, qual(ais)?

6 – Parto: () Cesariana () Normal

7 – Com quantas semanas o bebê nasceu?

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DO VALE DO
PARAÍBA - UNIVAP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE ÓPTICA DA SALIVA DE INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM ESPECTRO AUTISTA

Pesquisador: Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57011716.8.0000.5503

Instituição Proponente: Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.749.222

Apresentação do Projeto:

Não foram necessárias mudanças do projeto original. De acordo com parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Não foram necessárias mudanças do projeto original. De acordo com parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não foram necessárias mudanças do projeto original. De acordo com parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não foram necessárias mudanças do projeto original. De acordo com parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE corrigido conforme sugestões do CEP. Foram acrescentados os termos de assentimento para crianças alfabetizadas e não alfabetizadas de acordo com parecer anterior.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto foi corrigido de acordo com todas as recomendações, inclusive com a apresentação dos devidos termos de assentimentos por ser tratar de pesquisa envolvendo menores alfabetizados e

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911

Bairro: Urbanova

CEP: 12.244-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-1111

Fax: (12)3947-1149

E-mail: cep@univap.br

**UNIVERSIDADE DO VALE DO
PARAÍBA - UNIVAP**



Continuação do Parecer: 1.749.222

não alfabetizados.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_738597.pdf	18/08/2016 19:43:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BROCHURA_CORRIGIDA.docx	18/08/2016 19:43:28	Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_CRIANCAS_NAO_ALFABETIZADAS.docx	18/08/2016 19:35:54	Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_CRIANCAS_ALFABETIZADAS.docx	18/08/2016 19:35:00	Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_FINAL.docx	18/08/2016 19:34:44	Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	18/08/2016 19:34:24	Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	18/08/2016 19:34:03	Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostoassinada.pdf	13/06/2016 13:10:18	Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 27 de Setembro de 2016

Assinado por:
Juliana Ferreira Strixino
(Coordenador)

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911

Bairro: Urbanova

CEP: 12.244-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-1111

Fax: (12)3947-1149

E-mail: cep@univap.br