

**Nádia Isaac da Silva**

**Identificação de candidatos à biomarcadores  
urinários para o Transtorno do Espectro do Autismo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciência.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ivo Lebrun

**SÃO PAULO**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Nádia Isaac da

Identificação de candidatos à biomarcadores urinários para o Transtorno do Espectro do Autismo/ Nádia Isaac da Silva, São Paulo. – 2019.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. Ivo Lebrin

1. Transtorno autístico/diagnóstico. 2. Diagnóstico/utilização. 3. Biomarcadores/metabolismo. 4. Urina/fisiologia.

SES/CCD/CD-375/2018

## **Dedicatória**

*Ao meu Deus e Pai, Amigo Fiel, Consolador, que está comigo em todo momento.*

*A Virgem Santíssima, Nossa Senhora de Guadalupe, mãe dos pobres e aflitos. Padroeira das Américas.*

*Aos meus pais, os maiores amores da minha vida a quem dedico todas as minhas vitórias.*

*A todos os pais de autistas que permitiram a participação de seus filhos no projeto e acreditaram em nosso trabalho.*

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Aos membros da secretaria da Pós-Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças. A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, pelos valiosos ensinamentos.

Ao orientador, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Ivo Lebrun, pela competência e respeito com que conduziu este processo, do alvorecer da ideia até a sua síntese. Obrigada pelos momentos de aprendizagem e paciência.

A todos os membros que participaram da banca de qualificação contribuindo com suas críticas e sugestões.

Ao Instituto Butantan, pela oportunidade de desenvolver o meu projeto de doutorado e pela infraestrutura.

A minha mãe Isaltina pelo seu apoio e convicção de que tudo daria certo no final. Ao meu padrasto Darcí (TITI), companheiro de todas as coletas de urina. Obrigada por vocês estarem sempre na minha caminhada.

Ao meu pai Waltenes, pelo seu carinho e apoio constante. Obrigada por me dar bom dia e sua bênção todos os dias, mesmo que sejam pelo whatsapp.

As minhas irmãs Vívía e Juliana pela amizade e companheirismo. Nos períodos de muito cansaço Juliana você foi um ouvido amigo.

Ao meu sobrinho Gabriel que sempre dizia “Fica fria tia, vai dar tudo certo”.

Ao Profº Drº Carlos Labate, que permitiu estagiar no Laboratório Max Feffer e a especialista de laboratório Drª Thaís Regiani Cataldi pelos ensinamentos e paciência durante o estágio.

A Drª Paula Opromolla por sua valiosa contribuição na revisão da metodologia.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, do Instituto Butantan, onde aprendi valiosas lições.

Ao técnico de laboratório Admilson Cunha. Para mim você é mais que um técnico, me ajudou muito, foi e sempre será um bom amigo. Obrigada pelo trabalho que desenvolveu em meu projeto. Serei eternamente grata. Ao Drº Douglas Mariano pelas análises de espectrometria de massa e proteômica como também no auxílio para compreensão dos dados obtidos. A Drª Aline Vívian Vatti Auada e colegas de laboratório Hugo e Yacov.

Aos diretores das instituições Centro Infantil - Lucinda Tank Kühn, E.M.E.I.E.F- Pastor Ismael Pereira do Lago, E.M.E.I.E.F- Maria Aparecida Machado Julianelli, E.M.E.I.E.F- Profº Noedir Tadeu Santini, E.E Leontina Silva Busch e Dispensário Madre Teresa de Calcutá, os quais contribuíram para a captação de voluntários.

A toda equipe do CEMA (Centro de Especialização Municipal do Autista) da cidade de Limeira, em especial Cilene Falascina e Josiane Prata. A equipe do Núcleo de Ensino e Socialização do Autista (NESA) da cidade de Mogi - Guaçu. Agradecimento especial para amiga Arlete de Lima Michelin, mãe e presidente executiva.

Meu profundo agradecimento e respeito aos familiares das crianças com TEA, por colaborarem e permitirem a participação de seus filhos no projeto.

Aos familiares das crianças neurotípicas. Obrigada por permitir a participação de seus filhos. Vocês deram uma lição de solidariedade.

Aos amigos de caminhada Elaine Kairalla, Maria Lúcia, Flávia, Tedy e Roberto, Tatiane (minha dentista). Vocês moram no meu coração e fazem parte da família.

Ao padre Danilo Rodrigues. Um amigo que me deu apoio desde o início, não me permitiu desistir e gentilmente custeio todos os meus gastos com transporte no segundo semestre do doutorado.

Ao diretor Juarez Giusti e coordenadora de promoção social Marcela Hipólito do SEST/SENAT – Unidade C 105- Limeira/SP. Obrigada por permitir a flexibilização do horário de trabalho para a conclusão do doutorado e também por me ensinarem que toda etapa de nossa vida é uma possibilidade de aprendizado que deve ser valorizada.

A psicóloga e amiga Jaqueline Silva. Obrigada por ouvir meu pedido de socorro e me dar a mão. Você e Rogers me ensinaram que o mais importante da comunicação é a escuta. Saber escutar pode salvar vidas.

## **Apoio Financeiro**

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de apoio financeiro para a conclusão do doutorado.

## Epígrafe

*“E penso que é assim mesmo que a vida se faz: de pedaços de outras gentes que vão se tornando parte da gente também. E a melhor parte é que nunca estaremos prontos, finalizados...haverá sempre um retalho novo para adicionar à alma. Portanto, obrigada a cada um de vocês, que fazem parte da minha vida e que me permitem engrandecer minha história com os retalhos deixados em mim. Que eu também possa deixar pedacinhos de mim pelos caminhos e que eles possam ser parte das suas histórias. E que assim, de retalho em retalho, possamos nos tornar, um dia, um imenso bordado de nós”.*

*Crís Pizziment*



## Resumo

**Introdução:** O transtorno do espectro do autismo (TEA) é um distúrbio do desenvolvimento caracterizado por um quadro que envolve as áreas da interação social, da comunicação e do comportamento como também sensibilidade sensorial. Até o momento não existem biomarcadores que definam o TEA. **Objetivo:** Detectar metabólitos em urina de crianças com TEA por meio de diferentes técnicas analíticas e comparar com metabólitos de grupos controle com a finalidade de compor perfil metabólico específico para indivíduos com TEA. **Material e métodos:** A pesquisa consiste em um estudo observacional retrospectivo, de desenho caso-controle. Os casos foram crianças (n=22) com TEA, do sexo masculino na faixa etária de 3 a 10 anos que foram comparados com crianças (n= 22) com desenvolvimento típico, pareadas por sexo e idade. As técnicas laboratoriais utilizadas para a identificação de metabólitos foram: quantificação de proteínas totais, separação e determinação da composição de aminoácidos por cromatografia líquida CLUE, determinação da concentração de creatinina, perfil eletroforético de compostos proteicos, análise de espectrometria por método MALDI-TOF e estudo proteômico por meio de LC-ESI-IT-TOF/MS. **Resultados:** A concentração de proteína do grupo de crianças com TEA foi significativamente inferior ao grupo controle constituído por crianças neurotípicas. Na análise dos aminoácidos foi observado que amostras de urina de crianças com TEA apresentaram maior concentração dos aminoácidos arginina, glicina, leucina e treonina e menor concentração dos aminoácidos ácido aspártico, alanina, histidina e tirosina quando comparadas com amostras do grupo controle. A concentração de creatinina nas amostras de urina não apresentou diferença estatística entre os grupos observados. Na análise de eletroforese SDS-PAGE um composto com peso molecular de 250 kDa foi identificado com elevada frequência em urina de crianças com TEA. A busca em literatura sugere que seja a fibronectina plasmática. Na análise de espectrometria de massa foi identificado espectro de 654 Da com maior frequência em amostras de crianças neurotípicas e

também um espectro de 1911 Da presente em maior número de amostras de crianças com TEA. A pesquisa em banco de dados sugeriu coproporfirina II e IV, gangliosídeo GT2 (d18:0/14:0) respectivamente. A análise proteômica identificou o espectro de 1911 Da como fragmento da glicoproteína uromodulina. **Conclusões:**A concentração de creatinina em urina não é um marcador metabólito consistente. As análises da concentração total de proteína e perfil de aminoácidos podem ser consideradas fortes candidatas a biomarcadores. Apesar do resultado da análise proteômica divergir da análise de espectrometria de massa em relação à natureza dos compostos identificados, não pode ser excluída a possibilidade da existência de todos os compostos identificados nas amostras de urina dos grupos de participantes.

## Abstract

**Introduction:** Autism spectrum disorder (ASD) is a developmental disorder characterized by a framework that involves the areas of social interaction, communication and behavior as well as sensory sensitivity. To date there are no biomarkers that define TEA. **Objective:** To detect metabolites in the urine of children with ASD through different analytical techniques and to compare them with metabolites of control groups in order to compose specific metabolic profile for individuals with ASD. **Material and methods:** The study consists of a retrospective observational study of case-control design. The cases were children (n = 22) with ASD, males aged 3 to 10 years who were compared with children (n = 22) with typical development, matched by sex and age. The laboratory techniques used for the identification of metabolites were: quantification of total proteins, separation and determination of amino acid composition by CLUE liquid chromatography, determination of creatinine concentration, electrophoretic profile of protein compounds, analysis of spectrophotometry by MALDI-TOF method and study by LC-ESI-IT-TOF / MS. **Results:** The protein concentration of the group of children with ASD was significantly lower than the control group constituted by neurotypical children. In the analysis of the amino acids, it was observed that urine samples from children with TEA had a higher concentration of the amino acids arginine, glycine, leucine and threonine and lower concentration of the amino acids aspartic acid, alanine, histidine and tyrosine when compared with samples from the control group. The creatinine concentration in the urine samples did not present statistical difference between the groups observed. In the SDS-PAGE electrophoresis analysis a compound with a molecular weight of 250 kDa was identified with high urine frequency in children with ASD. The literature search suggests that it is plasma fibronectin. In mass spectrometry analysis we identified 654 Da spectrum with the highest frequency in samples of neurotypical children and also a 1911 spectrum of the present in the largest number of samples of children with ASD. The database search suggested coproporphyrin II and IV, ganglioside GT2 (d18:

0/14: 0) respectively. Proteomic analysis identified the 1911 Da spectrum as a fragment of the uromodulin glycoprotein. **Conclusions:** Creatinine concentration in urine is not a consistent metabolic marker. Analyzes of total protein concentration and amino acid profile may be considered strong biomarkers. Although the result of the proteomic analysis diverges from the mass spectrometry analysis in relation to the nature of the identified compounds, the possibility of the existence of all the compounds identified in the urine samples of the participant groups can not be ruled out.

## Lista de abreviaturas e siglas

ABA	Análise do Comportamento Aplicada ( <i>Applied Behavior Analysis</i> )
ACN	Acetonitrila
ADP	Difosfato de Adenosina
AGAT	L- Arginina:Glicina Amidinotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCAA	Aminoácidos de Cadeia Ramificada
BSA	Soroalbumina Bovina
°C	Grau Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
cAMP	Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
CCL-2	Quimiocina C-C Motif Ligante - 2
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDS	Síndromes de Deficiência de Creatina ( <i>Creatine Deficiency Syndrome</i> )
CHCA	Ácido $\alpha$ -Ciano-4-Hidroxicinâmico
CID-10	Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde 10ª edição
CK	Enzima Creatina-Quinase
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
c-MET	Receptor de Tirosina Quinase c - MET
CNV	Varição no Número de Cópias ( <i>Copy Number Variation</i> )
D-Asp	Ácido D-aspártico
dL	Decilitro
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais ( <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> )

EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético ( <i>Ethylenedeamine Tetra Acetic Acid</i> )
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ESI-MS	Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray ( <i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> )
FN	Fibronectina
GAA	Guanidinoacetato
GABA	Ácido $\gamma$ -Amino Butírico
GAD	Enzima Descarboxilase do Ácido Glutâmico ( <i>Glutamic Acid Decarboxylase</i> )
GAM	Guanidinoacetato Metiltransferase
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa
GLDH-1	Glutamato Desidrogenase 1
GLDH-2	Glutamato Desidrogenase 2
GTPCH	GTP Ciclohídroclase I
HGF	Fator de Crescimento Hepatocítico ( <i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i> )
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano - DR ( <i>Human Leukocyte Antigen - DR</i> )
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPLC-FLD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12p40	Interleucina-12p40
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-4	Interleucina-4

IL-6	Interleucina-6
K <sup>+</sup>	Potássio
L- Asp	Ácido L-aspártico
LC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas ( <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> )
MALD-TOF	Ionização por Dessorção a Laser e Análise por Tempo de Vôo ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i> )
MET	Gene de transição epitélio-mesenquimal ( <i>Mesenchymal-Epithelial Transition Factor</i> )
M	Mu
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama/Mililitro
mGluR	Receptor Glutaminérgico Metabotrópico
μl	Microlitro
mmol/L	Milimol/Litro
mTOR	Alvo Mecanicista da Rapamicina ( <i>Mechanistic Target of Rapamycin</i> )
N <sup>5</sup> , N <sup>10</sup> - metileno – THF	N <sup>5</sup> , N <sup>10</sup> - Metileno - Tetra – Hidrofolato
Na <sup>+</sup>	Sódio
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NK	Células Natural Killer
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico ( <i>Nitric oxide</i> )
PAG	Glutaminase Ativada por Fosfato ( <i>Phosphate-Activated Glutaminase</i> )

PHA	Fitohemaglutinina
POP	Prolil Oligopeptidase
PTPS	6-Piruvil Tetrahidrobiopterina Sintase
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
QI	Quociente de Inteligência
Receptor NMDA	Receptor N-metil D-Aspartato
RP - HPLC	Cromatografia Líquida de Fase Reversa ( <i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i> )
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS - PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-dodecil Sulfato de Sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismos de Nucleotídeo Único ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
SR	Sepiapterina
TAL	Ramo Ascendente Espesso ( <i>Thick Ascending Limb</i> )
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico ( <i>Tricarboxylic Acid Cycle</i> )
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEA	Transtorno do Espectro do Autismo
TEACCH	Tratamento e Educação Para Autistas e Crianças Com Déficits Relacionados Com a Comunicação ( <i>Treatment and Education of Autistic and related Communication-handicapped Children</i> )
TFA	Ácido Trifluoroacético
TGI	Trato Digestório
TID	Transtornos Invasivos do Desenvolvimento
TID-SOE	Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação



TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- Alfa
TrK	Receptor Tirosina Quinase
UFLC	Cromatografia Líquida Ultra Rápida ( <i>Ultra Fast Liquid Chromatograph</i> )

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b>	Quadro clínico heterogêneo do TEA. Os sintomas centrais associados com uma gama variada de comorbidades.....	<b>29</b>
<b>Figura 2:</b>	Ilustração da interação entre os fatores genético e ambientais para o desenvolvimento do TEA.....	<b>32</b>
<b>Figura 3:</b>	Fatores de risco ambientais para o TEA e suas respectivas janelas de susceptibilidade.....	<b>33</b>
<b>Figura 4:</b>	Características dos casos e grupo controle.....	<b>58</b>
<b>Figura 5:</b>	Fluxograma fracionamento das amostras de urina armazenadas em coletores a temperatura de $-80^{\circ}\text{C}$ . .....	<b>62</b>
<b>Figura 6:</b>	Gráfico Box Plot ilustra a mediana da faixa etária dos grupos de participantes avaliados.....	<b>70</b>
<b>Figura 7:</b>	Gráfico de dispersão das concentrações de proteína em amostras de urina dos grupos observados com respectivos valores de mediana. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Valor de $U= 114.50$ e $p= 0.0014$ .....	<b>71</b>
<b>Figura 8:</b>	Cromatograma do perfil de aminoácidos de criança com TEA e de seu respectivo controle. Detecção em 254nm. Fase móvel A (470 mL solução tampão + 30 mL de ACN) e fase móvel B (400ml ACN + 100 $\mu$ l solução de EDTA em pH 8,0).....	<b>72</b>
<b>Figura 9:</b>	Gráficos de dispersão dos valores de aminoácidos identificados em amostras de urina que tiveram valores de p significativos.....	<b>75</b>
<b>Figura 10:</b>	Gráfico de dispersão das concentrações de creatinina em amostras de urina dos grupos observados com respectivos valores de mediana. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Valor de $U= 187.50$ e $p = 0.1004$ .....	<b>76</b>

<b>Figura 11:</b>	Gráfico de barras ilustra a quantidade de bandas identificada em amostras de urina dos grupos de participantes observados por método de eletroforese SDS-PAGE.....	<b>77</b>
<b>Figura 12:</b>	Gráfico de barras empilhadas ilustra a frequência das bandas identificadas em amostras de urina dos grupos de participantes observados por método de eletroforese SDS - PAGE de acordo com peso molecular.....	<b>78</b>
<b>Figura 13:</b>	Gráfico de barras ilustra a distribuição das bandas identificadas em amostras de urina por método de eletroforese SDS-PAGE de acordo com o grupo de participantes que foram detectadas.....	<b>79</b>
<b>Figura 14:</b>	Gel de SDS-PAGE de urina de grupo controle formado por crianças com TEA e crianças neurotípicas corado por imersão em solução de Coomassie Blue R-250. Nessa figura podem ser observadas as bandas com peso molecular de 10 kDa e 250 kDa.....	<b>80</b>
<b>Figura 15:</b>	Gráfico de barras ilustra a frequência das bandas de peso molecular de 10 kDa e 250 kDa identificadas por método de eletroforese SDS-PAGE nas amostras de urina dos grupos de participantes avaliados.....	<b>81</b>
<b>Figura 16:</b>	Estrutura química da fibronectina plasmática e seus domínios de ligação com diferentes compostos.....	<b>82</b>
<b>Figura 17:</b>	Estrutura química da fibronectina I.....	<b>82</b>
<b>Figura 18:</b>	Gráfico de barras ilustra o número de espectros de massas identificado em amostras de urina dos grupos de participantes observados por método de espectrometria de massa MALDI-TOF.....	<b>83</b>
<b>Figura 19:</b>	Gráfico de barras ilustra a distribuição dos espectros de massas identificado em urina por método de análise por espectrometria de massa MALDI-TOF distribuídos de acordo com o grupo de participantes que foram observados.....	<b>84</b>

<b>Figura 20:</b>	Gráfico de barras ilustra frequência dos espectros de massas com maior relevância identificados em amostras de urina dos grupos de participantes por método de análise de espectrometria de massa MALDI-TOF.....	<b>85</b>
<b>Figura 21:</b>	Estrutura química dos metabólitos sugeridos pelos bancos de dados.....	<b>86</b>
<b>Figura 22:</b>	Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF confirmando a identidade do fragmento de uromodulina VLNLGPITR com peso molecular de 981.597 Da como também o quadro de íons fragmentados.....	<b>88</b>
<b>Figura 23:</b>	Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF confirmando a identidade do fragmento de uromodulina VIDQSRVLNLGPITR com peso molecular de 1679.968 Da como também o quadro de íons fragmentados.....	<b>89</b>
<b>Figura 24:</b>	Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF confirmando a identidade do fragmento de uromodulina SVIDQSRVLNLGPITR com peso molecular de 1767.000 Da como também o quadro de íons fragmentados.....	<b>90</b>
<b>Figura 25:</b>	Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF confirmando a identidade do fragmento de uromodulina SGSVIDQSRVLNLGPITR com peso molecular de 1911.053 Da como também o quadro de íons fragmentados.....	<b>91</b>
<b>Figura 26:</b>	Resumo das atividades fisiológicas desempenhadas pelos aminoácidos com concentrações alteradas em amostras de urina de crianças com TEA.....	<b>113</b>

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1:</b>	Resumo de peptídeos identificado em urina de autistas com sua respectiva fonte exógena de origem alimentar.....	<b>43</b>
<b>Quadro 2:</b>	Resumo de compostos identificados na urina de grupo de autistas resultantes de alterações da microbiota intestinal.....	<b>44</b>
<b>Quadro 3:</b>	Resumo de resultados de estudos que determinaram a concentração de aminoácidos em urina de indivíduos com TEA.....	<b>53</b>
<b>Quadro 4:</b>	Condições cromatográficas separação e determinação da composição de aminoácidos de amostras de urina por CLUE.....	<b>64</b>
<b>Quadro 5:</b>	Compostos identificados em bancos de dados a partir do peso molecular dos espectros de maior frequência em amostras de urina dos participantes observados.....	<b>86</b>
<b>Quadro 6:</b>	Compostos identificados a partir da análise proteômica e suas respectivas frequências em amostras de urina dos grupos de participantes observados.....	<b>87</b>

## Índice

<b>1- Introdução</b> .....	25
1.1- Histórico.....	25
1.2- Evolução do conceito e classificação do autismo .....	27
1.3- Quadro clínico, prevalência, etiologia e diagnóstico do TEA .....	29
1.4- Biomarcadores.....	35
1.4.1- Urina humana fonte de biomarcadores.....	36
1.5- Alterações fisiológicas fonte de biomarcadores em indivíduos portadores de TEA.....	37
1.5.1- Alterações do trato digestório .....	38
1.5.1.1- Biomarcadores urinários relacionados ao trato digestório .....	41
1.5.1.2- Peptídeos opioides exógenos de origem alimentar .....	41
1.5.1.3- Outros compostos.....	44
1.5.2- Alterações do sistema imunológico .....	45
1.5.2.1- Resposta celular inata .....	46
1.5.2.2- Resposta adaptativa .....	47
1.5.2.3- Biomarcadores urinários relacionados ao sistema imunológico ..	48
1.5.3- Alterações de vias metabólicas .....	50
1.5.3.1- Biomarcadores urinários relacionados a alterações metabólicas – creatina .....	50
1.5.3.2- Biomarcadores urinários relacionados a alterações metabólicas - aminoácidos.....	52
<b>2- Objetivos</b> .....	57
2.1- Objetivo geral.....	57
2.2- Objetivos específicos .....	57

<b>3- Casuística, material e métodos</b> .....	59
3.1- Delineamento e período de estudo.....	59
3.2- Casuística.....	59
3.2.1- Triagem dos participantes .....	60
3.2.2- Critérios de inclusão e exclusão dos participantes com TEA .....	60
3.2.3- Critério de inclusão e exclusão dos participantes do grupo controle de crianças com desenvolvimento típico pareados por sexo e idade .....	61
3.2.4- Aspectos Éticos .....	61
3.5- Material e Métodos .....	62
3.5.2- Métodos.....	62
3.5.2.1- Coleta de amostras de urina.....	62
3.5.2.2- Descongelamento e fracionamento das amostras de urina .....	62
3.5.2.3- Quantificação de proteínas método de Bradford .....	64
3.5.2.4- Separação e determinação da composição de aminoácidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).....	64
3.5.2.5- Determinação de creatinina método cinético da reação de Jaffé	66
3.5.2.6- Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) .....	66
3.5.2.7- Análise por espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser e análise por tempo de voo (MALDI-TOF).....	67
3.5.2.8- Análise proteômica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) .....	68
3.5.2.9- Análise estatística.....	69
<b>4- Resultados</b> .....	71
4.1- Caracterização da população .....	71
4.2- Resultado quantificação de proteínas método de Bradford .....	71
4.3- Separação e determinação da composição de aminoácidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).....	73

4.4- Determinação de creatinina método cinético da reação de Jaffé .....	76
4.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	78
4.6- Análise por espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser e análise por tempo de voo (MALDI-TOF) .....	84
4.7- Análise proteômica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) .....	87
<b>5- Discussão</b> .....	<b>94</b>
<b>6- Conclusões</b> .....	<b>122</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>125</b>



# *Introdução*



## 1- Introdução

### 1.1- Histórico

Na literatura psiquiátrica, desde o início do século dezoito, são encontradas descrições de casos isolados do que hoje se reconhece como autismo. Apesar de algumas descrições serem muito ricas e denotarem transtornos psiquiátricos que partilhavam características autísticas, nenhum estudioso viu conexões entre os casos individuais até a última metade do século XIX (Wing, 1997; Goldberg, 2005).

Henry Maudsley em 1867 sugeriu que crianças com um comportamento “muito estranho” poderiam ser classificadas como portadoras de algum tipo de psicose infantil. Inicialmente essa ideia foi um choque para a sociedade da época, no entanto, vários pesquisadores começaram a descrever e a agrupar crianças e adolescentes com algum tipo de comportamento “bizarro” (Maudsley, 1867; Wing, 1997; Goldberg, 2005).

Em 1906, Plouller introduziu o adjetivo autista na literatura psiquiátrica, ao estudar pacientes que tinham diagnóstico de demência precoce, mas foi Bleuler, em 1911, o primeiro a difundir o termo autismo, como transtorno básico da esquizofrenia caracterizado por uma limitação das relações pessoais e com o mundo externo, parecendo excluir tudo que parecia ser o “eu” da pessoa (Bleuler, 1911; Camargos Jr et al., 2007).

O termo “autismo”, aplicado à esquizofrenia, propagou-se rapidamente na literatura médica europeia. Na Alemanha, em 1920, Künkel se referiu a um grupo de crianças esquizofrênicas como “autistas”. A psiquiatra russa Grunja Jefimov Ssucharewa (1926) adotou o conceito de “atitude autista” para nomear o comportamento observado em seis crianças portadoras de transtorno de personalidade esquizoide. Posteriormente, Potter (1933) e Despert (1938) descreveram crianças com problemas de relação afetiva e outros traços de comportamento autista.

No ano de 1943, duas descrições de crianças que apresentavam déficits sociais graves e incomuns foram publicadas. Os autores usaram o termo “autista” para designar uma condição clínica que se diferenciava da esquizofrenia e psicose infantil. Essas publicações são consideradas as primeiras descrições relevantes sobre o autismo (Lyons & Fitzgerald, 2007).

O psiquiatra Léo Kanner, em Baltimore, EUA, sistematizou a cuidadosa observação de um grupo de onze crianças com idades que variavam entre dois e oito anos, em seu artigo “Autistic Disturbance of Affective Contact”<sup>1</sup>. Em seu trabalho, afirmou ter identificado uma condição rara e com sintomas presentes desde o início da vida. Ele descreveu alterações comportamentais que se repetiam e permaneciam inalteradas ao longo do tempo como: apego completo às rotinas do dia a dia, isolamento extremo e preferência por objetos inanimados em detrimento das pessoas. Relatou, ainda, atraso na aquisição da linguagem, uso não comunicativo da linguagem após o seu desenvolvimento, tendência à repetição da fala do outro (ecolalia), uso reverso de pronomes, brincadeiras repetitivas e estereotipadas, falta de imaginação, boa memória mecânica e aparência física normal. Todas as características descritas, muitas vezes, estavam associadas à deficiência intelectual. No ano de 1944, Kanner deu a esse conjunto de sinais e sintomas o nome de “autismo infantil precoce”. O trabalho deteve grande relevância para a construção do conceito de autismo por ter sido editado nos Estados Unidos, onde alcançou uma notável difusão no campo da psiquiatria infantil (Wolff, 2004; Brasil, 2014).

Hans Asperger desconhecedor do trabalho de Kanner, defendeu sua tese intitulada “Die ‘Autistischen Psychopathen’ im Kindesalter”<sup>2</sup>, a qual foi publicada no ano de 1944. Nela relatou casos de quatro meninos na faixa etária de sete a onze anos. Ele afirmava que a “psicopatia autista” era uma condição frequente, mas rara em meninas. Os pacientes identificados por Asperger mostravam um padrão de conduta semelhante aos dos pacientes

---

<sup>1</sup> Autistic Disturbance of Affective Contact- Distúrbios Autísticos do Contato Afetivo

<sup>2</sup> Die ‘Autistischen Psychopathen’ im Kindesalter - A Psicopatia Autista na Infância

de Kanner, exceto pela preservação da capacidade verbal e cognitiva. O quadro clínico era caracterizado por falta de empatia, ingenuidade, pouca habilidade para fazer amigos, linguagem pedante e repetitiva, comunicação não verbal pobre, interesse exagerado por um determinado tema, inabilidade motora e falta de coordenação. Por efeito, de todos os seus trabalhos terem sido escritos em alemão durante a era nazista foram praticamente ignorados pela psiquiatria e neurologia na maioria dos países. O reconhecimento começou por volta de 1981, após a publicação das traduções (alemão para o inglês) de suas obras feitas por Lorna Wing. Em retribuição ao trabalho a condição descrita por ele recebeu seu nome a Síndrome de Asperger (Artigas-Pallarés & Paula-Pérez, 2012; Volkmar, McPartland, 2014; Artigas-Pallarés & Paula-Pérez, 2017).

## **1.2- Evolução do conceito e classificação do autismo**

Durante os anos cinquenta e sessenta, houve muita confusão sobre a natureza do transtorno e sua etiologia. Nesse período uma das principais linhas de pesquisa focava na crença de que pais não emocionalmente responsivos eram responsáveis pelo transtorno em seus filhos (a hipótese da “mãe geladeira”). Concomitantemente houve um forte movimento que considerava o autismo como a primeira manifestação de psicose infantil ou esquizofrenia por isso, durante muito tempo, os conceitos de autismo, psicose e esquizofrenia se confundiram e foram usados de maneira intercambiável (Klin, 2006; Lima, 2014). Nos anos 60 ocorreu um aumento do número de evidências científicas de que o autismo era um transtorno neurobiológico (Rimland, 1964). No final da década de setenta, os primeiros estudos com gêmeos apresentaram uma forte base genética para a condição (Folstein & Rutter 1977). Um grande passo para classificação do autismo ocorreu a partir da publicação dos estudos de Kolvin (1972) e Rutter (1972). Neles os autores comprovaram que o autismo era diferente da esquizofrenia (mesmo na esquizofrenia infantil) em termos de aparecimento, características clínicas e história familiar (Volkmar & McPartland, 2014).

Apenas no início da década de 80, o autismo recebeu seu reconhecimento oficial, como patologia distinta da esquizofrenia e com um contexto evolutivo próprio. O autismo foi retirado da categoria de psicose no DSM<sup>3</sup>-III e na CID-10, passando a fazer parte dos transtornos invasivos do desenvolvimento (TID) juntamente com o transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação (TID-SOE) (Bosa, 2002).

No ano de 1994 o DSM-IV trouxe o autismo como integrante dos TID, juntamente com TID-SOE, transtorno desintegrativo da infância, síndrome de Rett e síndrome de Asperger. Tanto a CID-10 quanto o DSM-IV estabeleceram como critério para o autismo, o comprometimento em três áreas principais: alterações qualitativas das interações sociais recíprocas; modalidades de comunicação; atividades e interesses restritos, estereotipados e repetitivos. A partir das mudanças citadas, os sistemas de classificação do DSM-IV e da CID-10 tornaram-se equivalentes (WHO, 1992; Bosa, 2002; Klin, 2006; APA, 2013).

A quinta edição do DSM foi publicada em maio de 2013 e trouxe uma grande mudança no conceito do autismo. Nessa última versão, com exceção da síndrome de Rett, os transtornos pertencentes ao TID, que possuíam diagnóstico distinto, foram condensados em um único diagnóstico, o “transtorno do espectro do autismo” (TEA). A nova edição também trouxe uma nova estrutura de sintomas, e a tríade de sintomas que modelava déficits de comunicação separadamente de prejuízos sociais do DSM-IV, foi substituído por um modelo de três domínios composto por um domínio relativo a déficit de comunicação social, o segundo aos comportamentos e interesses restritos e repetitivos, e o terceiro integrado por sensibilidade sensorial. A distinção entre os casos é feita de acordo com o nível de gravidade que cada domínio foi afetado (Araújo & Lotufo Neto, 2014; Volkmar & McPartland, 2014).

---

<sup>3</sup> Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais.

### **1.3- Quadro clínico, prevalência, etiologia e diagnóstico do TEA**

O TEA é um distúrbio do desenvolvimento caracterizado por um quadro comportamental peculiar e que envolve sempre as áreas da interação social, da comunicação e do comportamento. O transtorno por ser um espectro de condições, manifesta de forma heterogêneo o que implica em manifestações clínicas com grande variabilidade quanto à intensidade dos prejuízos presentes em cada área de comprometimento (Brunoni, Mercadante, Schwartzman, 2014).

O surgimento dos sintomas ocorre geralmente antes dos três anos de idade. Na primeira infância, existe uma tendência de vinculação a objetos incomuns, tipicamente rígidos. A criança tende a insistir na realização de rotinas particulares e rituais de caráter não-funcionais. Verificam-se, em alguns casos, interesses tais como: datas, itinerários e estereotípias motoras. Além desses aspectos diagnósticos específicos, as crianças com TEA frequentemente demonstram uma série de outros problemas não específicos, como medos, fobias, ataques de birra e agressão. Os prejuízos na comunicação e linguagem são frequentes e, em geral, severos. Outros sintomas também comuns referem-se a uma hiper ou hiporreação a estímulos sensoriais, como luz, dor ou som. Muitas crianças não conseguem identificar situações de perigos reais como veículos em movimento ou grandes alturas (Camargos Jr et al., 2007; Masi et al., 2017).

Condições severas coexistem com o quadro de TEA. A deficiência intelectual está presente em níveis de severidade variados em aproximadamente 30% a 50% dos casos e mais da metade dessa população sofre de um distúrbio psiquiátrico como transtorno bipolar, depressão, ansiedade, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (Chakrabarti & Fombonne, 2005; Baird et al., 2006; Masi et al., 2017). Algumas condições médicas também estão presentes entre elas destacam-se: distúrbios do sono e de alimentação, epilepsia, alterações metabólicas relacionadas a proteínas e lipídeos, disfunção mitocondrial, anormalidades do trato digestório (TGI) e sistema imunológico, deficiências auditiva e visual.

Existem também quadros de TEA identificados coexistentes com outras patologias como a síndrome de Down, paralisia cerebral, síndrome do X-frágil, síndrome de Tourette (Devlin & Scherer, 2012; Masi et al., 2017). A figura 1 ilustra o quadro clínico do TEA que é composto pelos sintomas centrais do transtorno e diversas condições médicas.

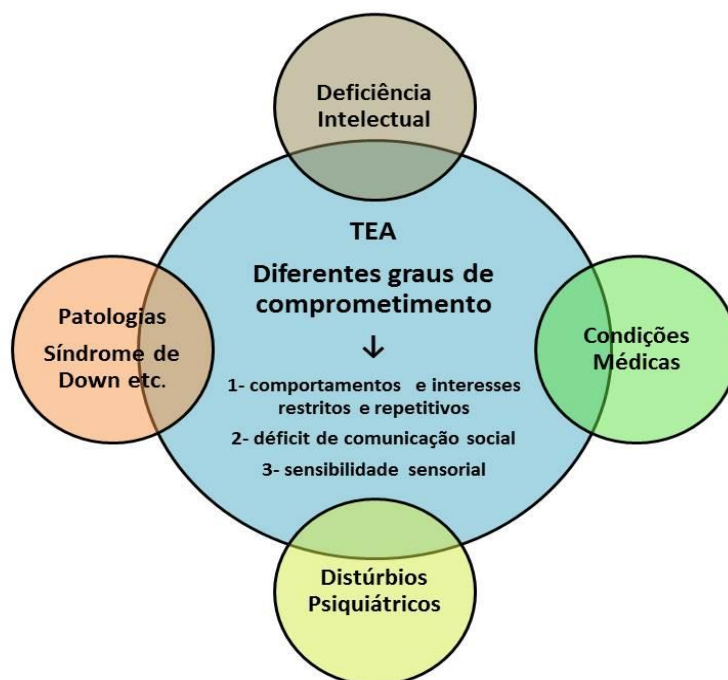


Figura 1- Quadro clínico heterogêneo do TEA. Os sintomas centrais associados com uma gama variada de comorbidades.

Fonte - Adaptado de Devlin & Scherer, 2012.

Os estudos sobre a prevalência do TEA apresentam resultados heterogêneos e inconsistentes. Até o momento nenhum trabalho epidemiológico oferece suporte para explicar as diferenças na prevalência entre regiões geográficas ou variabilidade com base em etnia ou fatores socioeconômicos (Elsabbagh et al., 2012; Masi et al., 2017).

Uma revisão sistemática de estudos epidemiológicos publicada em 2012 indicou uma prevalência média de 62/10.000 (Elsabbagh et al., 2012). No Brasil, um estudo piloto realizado na cidade de Atibaia, interior do estado de São Paulo, aponta para uma estimativa de 27.2/10.000 (Paula et al.,

2011). Em 2000, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) iniciou o monitoramento da prevalência do TEA em crianças de oito anos em seis a onze estados dos EUA. Relatórios iniciais estimaram a taxa de prevalência 6,7/1000, mas o último publicado em 2016 aponta para um índice de 14.6/1000 (CDC, 2007; Christensen et al., 2016).

Segundo literatura o aumento da prevalência está relacionado a uma combinação de fatores como a adoção de definições mais amplas do TEA, maior conscientização entre especialistas e comunidade não médica sobre as diferentes manifestações, melhor detecção de casos sem retardo mental e disponibilidade de serviços de atendimento especializado (Klin, 2006; Masi et al., 2017). Alguns estudos associam esse fato ao aumento da exposição pré ou pós-natal precoce materna a poluentes ambientais, tabaco e álcool (Lyll et al., 2014; Koufaris & Sismani, 2015).

O sexo masculino é mais afetado, sendo a proporção média de 4 a 5 homens para 1 mulher. Pesquisas sugerem que essa peculiaridade entre sexo é mediada por fatores biológicos ainda desconhecidos (Jacquemont et al., 2014).

A heterogeneidade das entidades clínicas que compõe o TEA é resultante de uma interação complexa entre genes de susceptibilidade múltipla e variável, efeitos epigenéticos e fatores ambientais. Estudos familiares e em gêmeos evidenciam a base genética da etiologia do TEA: a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos é alta (60% - 90%) em comparação com a taxa de concordância entre os gêmeos dizigóticos (0% - 30%) (Ronald et al., 2011; Sandin et al., 2014). O risco de recorrência entre irmãos é de 12,9% a 18,7% e a herdabilidade calculada entre 40% a 80% (Constantino & Todd, 2003; Ronald et al., 2006; Ozonoff et al., 2011; Sandin et al., 2014).

Apesar do reconhecimento do peso do fator genético sobre a etiologia do TEA apenas 10 a 20% dos indivíduos têm o mecanismo etiológico identificado (Abrahams & Geschwind, 2008). A arquitetura genética do transtorno é altamente heterogênea, resultante da interação de



fatores genéticos complexos, os quais são compostos por diferentes formas de variação genética, incluindo as anormalidades cromossômicas, variação no número de cópias (CNV - copy number variation); desordens monogênicas, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - single nucleotide polymorphism), mutações *de novo* e processos epigenéticos (Devlin & Scherer, 2012). Atualmente estima-se que 400 - 1000 genes estão relacionados ao TEA (Masi et al., 2017).

Estudos com gêmeos fornecem fortes evidências sobre o peso da contribuição dos fatores ambientais e genéticos para o desenvolvimento do transtorno. Um grande estudo independente baseado no Registro Nacional da População Sueca, com uma amostra constituída por 2.049.973 irmãos, na qual incluiu gêmeos dizigóticos e monozigóticos, estimou a responsabilidade etiológica de 50% para herdabilidade e 50% para influência ambiental (Sandin et al., 2014).

A natureza do gatilho ambiental ainda é controversa, estudos sobre fatores de risco associados ao TEA nos períodos pré-natal, perinatal e neonatal identificaram diabetes gestacional, ocorrência de infecções durante a gestação, hipertensão e proteinúria materna, pré-eclâmpsia, sangramento gestacional, idade materna e paterna avançada durante a concepção, migração materna, apresentação fetal anormal, complicações do cordão umbilical, score Apgar baixo/ 5-min, baixo peso ao nascer (<1500g), aspiração de mecônio, anemia neonatal, incompatibilidade ABO ou de Rh e hiperbilirrubinemia, deficiência de ácido fólico materna durante os períodos perinatal e gestacional (Gardener, Speigelman, Buka, 2009, 2011). Pesquisas também relataram uma consistente associação do TEA com exposição *in útero* a conhecidos medicamentos teratogênicos, a talidomida e valproato, ou o abortivo misoprostol (Strömland et al., 1994; Miles, 2011; Chaste & Leboyer, 2012; Schmidt et al., 2012; Bromley et al., 2013; Surén et al., 2013).

Atualmente fatores ambientais emergentes relacionados ao transtorno estão sendo estudados, entre eles se destacam a exposição pré

ou pós-natal precoce materna a poluentes ambientais (metais pesados, fertilizantes, pesticidas organofosforados, poluentes de trânsito), exposição materna ao tabaco e álcool, obesidade materna e paterna, elevado ganho de peso materno durante a gestação, ingestão materna de dieta rica em ácidos graxos saturados e deficiente em ômega - 3 e vitamina D durante a gestação (Koufaris & Sismani, 2015; Neggers, 2014). A figura 2 ilustra a interação entre fatores de risco e fatores genéticos que contribuem para o fenótipo do TEA.

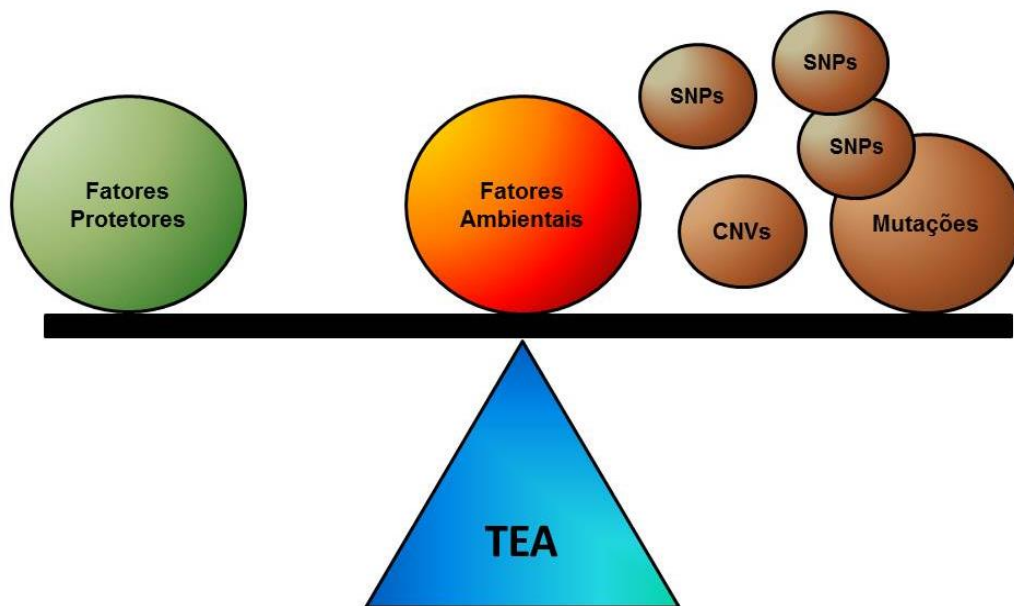


Figura 2 - Ilustração da interação entre os fatores genéticos e ambientais para o desenvolvimento do TEA

Fonte - Adaptado de Geschwind, 2008.

Os fatores ambientais de risco agem interrompendo o genoma como também epigenoma dos neurônios ou vias biológicas que afetam o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Estudos de imagem e autópsias indicam desregulação da neurogênese, migração e maturação neuronal. O processo de desenvolvimento é vulnerável no período pré-natal (primeiro trimestre) e no período pós-natal precoce. Dentro desses períodos as janelas de maior susceptibilidade variam de acordo com o agente ambiental (Landrigan, 2010; Dietert, Dietert, Dewitt, 2011; Lyall, Schmidt, Hertz-Picciotto, 2014; Kim & Leventhal, 2015). Na figura 3 está exposto um

resumo que contempla alguns fatores ambientais com suas respectivas janelas de susceptibilidade.

Trimestre	Primeiro									Segundo			Terceiro	
Semana Gestacional	1	2	3	4	5	6	7	8	9	16	20	22	28	38
Patologia Cérebro														
Neurogênese	1-20 semanas													
Migração neuronal	1-16 semanas													
Maturação neuronal	1-24 semanas													
Exposição														
Proximidade de auto estrada													3º trimestre	
Poluição do ar (tráfego)	1º, 2º e 3º trimestres													
Pesticidas				26-81 dias										
Deficiência vitaminas pré-natal	1º trimestre													
Deficiência ácido fólico	1º trimestre e antes do 3º trimestre													
Infecção rubéola	1-8 semanas													
Febre	1º e 2º trimestres													
Talidomida			20-24 dias											
Ácido valproico				22-28 dias										
*ISRS	1º trimestre													
Estressores pré - natais													25-28 semanas	

- Janelas de risco c/ fortes evidências científicas
- Janelas de risco c/ resultados inconclusivos
- \* Inibidor seletivo de recaptção de serotonina

Figura 3 - Fatores de risco ambientais para o TEA e suas respectivas janelas de susceptibilidade.

Fonte - Adaptado de Lyall, Schmidt, Hertz-Picciotto, 2014.

O diagnóstico é fundamentalmente clínico e baseado na presença dos sintomas referidos anteriormente. Os manuais de classificação mais utilizados são o DSM-5 - Manual de Classificação Diagnóstica da Academia Americana de Psiquiatria, lançado em 2013; e a CID-10 - Código Internacional de Doenças da Organização Mundial de Saúde, publicado em 1994 (Brunoni, Mercadante, Schwartzman, 2014).

Até o momento não existem marcadores biológicos ou endofenótipos que definam o diagnóstico do TEA. A avaliação requer uma equipe

multidisciplinar e o uso de uma série de instrumentos com o objetivo de uma maior padronização da maneira de diagnosticar entre os profissionais com diferentes formações e níveis de conhecimento sobre o assunto. Esses instrumentos devem ser utilizados para a avaliação tanto do comportamento social das crianças (atenção conjunta, contato visual, expressão facial de afeto) quanto da sua capacidade de imitação (Gadia, Tuchman, Rotta 2004; Brunoni, Mercadante, Schwartzman, 2014).

Após o diagnóstico é necessária uma apreciação clínica cuidadosa com avaliações de linguagem e neuropsicológica, bem como exames complementares em casos específicos. Entre os exames complementares destacam-se os estudos genéticos (cromossomas e CNVs), estudos de neuroimagem ou de neurofisiologia (Gadia, Tuchman, Rotta 2004; Brunoni, Mercadante, Schwartzman, 2014).

#### **1.4- Biomarcadores**

O termo "biomarcador" é uma abreviação de "marcador biológico" e sua primeira aparição em título de publicação ocorreu em 1980, referindo-se a um biomarcador do soro sanguíneo de pacientes com câncer de mama. Posteriormente, as vantagens do uso de biomarcadores em estudos sobre câncer e doenças cardíacas foram discutidas amplamente (Strimbu & Tavel, 2010; Beach, 2017). Para esclarecer ambiguidades crescentes, o termo recebeu uma definição de consenso postulada pelo National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group, que diz o seguinte:

“Marcadores biológicos (biomarcadores): uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (2001; p. 91)”.

Existem várias possibilidades para a utilização dos biomarcadores. Eles podem ser empregados nas primeiras avaliações de eficácia e segurança de estudos *in vitro* (amostras de tecido), estudos *in vivo* (modelos animais) e nos ensaios clínicos de fase inicial para estabelecer prova de conceito (NIH, 2001). Apesar do reconhecimento dos benefícios que os biomarcadores podem trazer e dos esforços realizados para a descoberta de novos, poucos deles estão sendo utilizados na prática clínica (Paulovich et al., 2008).

#### **1.4.1- Urina humana fonte de biomarcadores**

O uso de biomarcadores urinários não é uma prática recente, o filósofo Hermógenes (cinco séculos antes da era comum) descreveu a cor da urina e outros atributos como indicador certo de doenças. Durante muito tempo a glicose foi detectada em urina avaliando se formigas eram atraídas pela mesma. A presença de albumina na urina tem sido usada por séculos como indicador de doenças renais, avaliando sua capacidade de formar espumas após agitação. Nessa tradição, estudos para identificar biomarcadores de doenças em urina têm sido um latente componente de investigação da medicina em todo século XX e início do XXI (Pisitkun, Johnstone, Knepper 2006; Decramer et al., 2008; Harpole, Davis, Espina, 2017).

A urina é composta por substâncias resultante da filtração do sangue, secreção de proteínas dos túbulos renais e células específicas dos rins. Em indivíduos saudáveis, 70% das proteínas da urina provem dos rins e trato urinário, enquanto os 30% restantes representam proteínas filtradas pelos glomérulos. Esses fatos, fazem com que a urina seja uma fonte de informações dos rins, trato urinário e também de órgãos mais distantes (Decramer et al., 2008;). Ela, quando comparada com outros fluidos corporais possui características que a tornam o fluido de primeira escolha para pesquisas de biomarcadores. A principal vantagem do uso da urina nos

estudos de biomarcadores, além da natureza não invasiva e fácil acessibilidade, é que o paciente não é exposto a procedimentos desconfortáveis e não tem sua rotina de tratamento alterada. Os peptídeos e proteínas de baixo peso molecular são geralmente solúveis. A solubilização desses compostos é o processo de maior influência sobre a análise proteômica de células ou tecidos. Em geral, o conteúdo de proteína é relativamente estável provavelmente pelo fato de que a urina permanece estagnada por horas na bexiga e o processo de hidrólise endógena ocorre totalmente antes do esvaziamento (Decramer et al., 2008; Pejčić, Stojnev, Stefanovic, 2010; Kalantari et al., 2015).

Contudo, esse fluido corporal apresenta algumas desvantagens que devem ser superadas. A baixa concentração de alguns compostos, como por exemplo, proteínas, torna necessária a adoção de etapas adicionais de concentração das mesmas podendo levar a perdas. Ainda para o caso de proteínas, existem algumas delas que são abundantes, como a albumina, que podem mascarar outras proteínas, e dessa forma, uma etapa de depleção deve ser realizada. Por fim, a urina apresenta alto conteúdo de sal, o que é incompatível com algumas técnicas analíticas (Decramer et al., 2008; Kalantari et al., 2015).

### **1.5- Alterações fisiológicas fonte de biomarcadores em indivíduos portadores de TEA**

Não existem biomarcadores que definam o TEA, mas as disfunções do trato digestório e sistema imunológico assim como alterações metabólicas podem ser fontes de marcadores biológicos capazes de fornecerem informações que sirvam como uma linha de base para rastreamento e identificação de diferentes subgrupos mais homogêneos, de acordo com a manifestação comportamental e etiológica.

### 1.5.1- Alterações do trato digestório

A primeira evidência da relação entre disfunções do TGI e TEA foi descrita em 1971 por “Goodwin et al. que observaram em um grupo de crianças com TEA o quadro de má absorção intestinal. O resultado da pesquisa estimulou a investigação do aparelho digestório dessa população e diferentes alterações foram identificadas como: baixa atividade de enzimas digestivas responsáveis pela hidrólise de carboidratos, refluxo gastroesofágico, alergia alimentar e disfunção da produção de secretina (White, 2003; Hsiao, 2014).

Diversos estudos relataram elevada frequência de doenças inflamatórias em crianças com TEA e sintomas gastrointestinais submetidas a exames endoscópicos e histológicos. As lesões identificadas são caracterizadas por hiperplasia nodular linfoide ileocolônica e ileocolite. Alguns trabalhos também relatam grande ocorrência do quadro de esofagite, gastrite focal atípica e enterite (Horvath et al., 1999; Torrente et al., 2002; Torrente et al., 2004; Balzola et al., 2005; Krigsman et al., 2010).

Pesquisas de lesões inflamatórias do intestino curto e cólon de indivíduos com TEA comparadas com lesões de grupos controle revelaram que as lesões observadas em indivíduos com TEA são distintas daquelas encontradas em doenças inflamatórias conhecidas (colite ulcerativa e doença de Crohn) (Furlano et al., 2001; Torrente et al., 2002; Ashwood et al., 2004; Torrente et al., 2004). As lesões do cólon são caracterizadas por elevada densidade intraepitelial do número de células T CD8<sup>+</sup> e células T  $\gamma\delta$ , proeminente infiltrado de neutrófilos e eosinófilos, reduzida expressão do antígeno leucocitário humano (HLA-DR) na superfície de células da mucosa colônica, sugerindo uma resposta imunológica dominante do tipo T helper 2 (Th2) (Anthony et al., 1998; Furlano et al., 2001).

A presença de disbiose no intestino de indivíduos com TEA é um problema relatado em vários estudos. Uma das causas prováveis é a elevada incidência de doenças infecciosas nessa população durante a

infância que conduz ao consumo constante de antibióticos que tem como consequência o desequilíbrio da microbiota intestinal. Rosseneu (2003) avaliou oitenta crianças com diagnóstico de TEA e que manifestavam sintomas gastrointestinais. Ele identificou crescimento anormal de bactérias em 61% da população avaliada, sendo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* as bactérias de maior prevalência. Outras pesquisas também relataram crescimento elevado de diferentes espécies de *Clostridium* (exemplos *C. tetani*, *Clostridium bolteae* e *C. histolyticum*) e *Candida* bem como membros do gênero *Sutterella* (Bolte, 1998; Song, Liu, Finegold, 2004; Parracho et al., 2005; Williams et al., 2012; De Angelis et al., 2013; Kantarcioglu, Kiraz, Aydin, 2016.) .

Nos últimos anos aumentou o número de evidências de que a elevada prevalência de alterações do TGI entre crianças com TEA está relacionada aos fatores genéticos. Um gene de susceptibilidade que é particularmente interessante a este respeito é o gene de transição epitélio-mesenquimal (MET), um proto-oncogene, localizado no cromossomo 7, responsável pela codificação do receptor de tirosina quinase c-MET (c-MET). O fator de crescimento do hepatócito (HGF- hepatocyte growth factor receptor) é o único ligante conhecido para esse receptor. O c-MET dimeriza e autofosforila através da ligação com seu ligante, gerando uma cascata de sinais que regula uma variedade de processos biológicos, incluindo divisão celular, angiogênese, função imune, desenvolvimento do epitélio intestinal e desenvolvimento do cérebro (Organ & Tsao, 2011).

Campbel et al. (2009) identificaram a variante rs1858830 no gene MET que reflete um polimorfismo de nucleotídeo simples que está relacionada ao fenótipo de crianças com TEA acometidas por comorbidades relacionadas ao trato digestório. Consistentemente com esse resultado, Russo et al. (2009) relataram baixo nível de HGF no soro do grupo de crianças com TEA quando comparado com grupo controle. Esses resultados sugerem que a hipofunção de c-MET devido à variante genética rs1858830



predispõe especificamente ao fenótipo de um subgrupo de indivíduos com TEA que manifestam alterações do trato digestório (Hsiao, 2014).

Outro gene que está associado ao aumento da susceptibilidade para o TEA e disfunção do TGI é o SLC6A4, que codifica o transporte de membrana da serotonina (Coutinho et al., 2004; Sutcliffe et al., 2005; Weiss et al., 2005). A atividade elevada em plaquetas circulantes pode causar hiperserotonemia, ou aumento de serotonina no sangue, condição replicada em vários estudos e que acomete aproximadamente 30% de indivíduos portadores de TEA (Schain & Freedman, 1961; Mulder et al., 2004). O polimorfismo identificado em indivíduos com TEA está relacionado à disfunção do metabolismo da serotonina pelo TGI. Alterações do nível de serotonina e sinalização serotoninérgica no TGI estão associadas com uma variedade de condições patológicas incluindo a síndrome do intestino irritável, doenças inflamatórias intestinais e constipação idiopática (Costedio, Hyman, Mawe, 2007; Manocha & Khan, 2012).

Apesar das evidências, a diversidade das condições relacionadas ao TGI e ausência de um quadro específico não permitem até o momento definir uma relação causal. A elevada prevalência de sintomas gastrointestinais (24% - 84%) nessa população é o fator que permite apenas uma associação (Goodwin et al., 1971; Horvath et al., 1999; Molloy & Manning-Courtney, 2003). De acordo com os trabalhos publicados os sintomas comumente observados em crianças com TEA são: constipação, diarreia, inchaço, flatulência e desconforto abdominal (White, 2003; Hsiao, 2014).

O significado clínico da elevada prevalência de sintomas no TGI em crianças com TEA se estende além da resolução de sintomas gastrointestinais crônicos, especialmente devido à associação dos sintomas com características comportamentais do transtorno. Valcianti-McDermott et al. (2008) observaram uma relação entre a regressão da linguagem e padrões de fezes anormais em crianças com TEA. Mazurek et al. (2013) relataram aumento da ansiedade e diminuição da capacidade de resposta

social em pacientes com comportamento autista e sintomas gastrointestinais (constipação, dor abdominal, inchaço e náuseas). Em um estudo recente Peters et al. (2014) relataram uma relação entre comportamentos rígidos compulsivos e sintomas de constipação severa e diarreia.

#### **1.5.1.1- Biomarcadores urinários relacionados ao trato digestório**

Existem hipóteses para explicar a relação entre alterações do TGI e distúrbios de função e/ou desenvolvimento neurológico que resultem em TEA. Uma das teorias mais difundidas é a “teoria do intestino permeável”. De acordo com essa teoria, os processos inflamatórios, intolerância a alimentos, o desequilíbrio da microbiota intestinal e alteração da produção de serotonina podem levar ao aumento da permeabilidade intestinal. Essa condição permite a passagem de moléculas que normalmente não ultrapassam a parede intestinal para a corrente sanguínea e que podem ser prejudiciais ao SNC como toxinas de bactérias e substâncias que possuem afinidade por receptores do cérebro (Hsiao, 2014).

#### **1.5.1.2- Peptídeos opioides exógenos de origem alimentar**

O sistema opioide é formado por um conjunto de receptores ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) e peptídeos endógenos ligantes, distribuídos abundantemente no SNC e nos tecidos periféricos como o sistema imune, cardiovascular, endócrino e TGI. Os receptores têm o comportamento de interagir com peptídeos exógenos e diferentes substâncias sintéticas. Esse sistema é crucial para a manutenção da homeostase e sobrevivência do organismo e devido a sua ampla distribuição regula diversas respostas fisiológicas como a transmissão da nocicepção, atividade cardiovascular e ciclo circadiano. Ele também regula os níveis de ansiedade, caráter depressivo, perfil locomotor, memória, comportamento e atua no desenvolvimento do SNC, pois opera na

proliferação, migração e diferenciação celular cerebral (Janecka, Fichna, Janecki, 2004; Koneru, Satyanarayana, Rizwan, 2009).

Em 1978 Kalat escreveu um artigo sobre a similaridade entre TEA e drogadição por opioides. No mesmo ano Panksepp e colaboradores desenvolveram vários experimentos com animais jovens de diferentes espécies. Eles observaram que após a administração de baixas doses de drogas psicoativas e peptídeos opioides os animais manifestaram comportamento semelhante ao de crianças com TEA. Em 1979, com base nos resultados obtidos em artigo intitulado “A neurochemical theory of autism,”<sup>4</sup> Panksepp postulou a teoria de que o TEA é um distúrbio emocional resultante da sobrecarga do sistema opioide.

Estudos posteriores com humanos reforçaram a teoria. Análises revelaram elevada concentração de  $\beta$ -endorfina no líquido cefalorraquidiano e plasma de indivíduos com TEA (Gillberg, Terenius, Lonnerhom, 1985; Ross, Klykylo, Hitzemann, 1987; Tordjman et al., 1997; Leboyer et al., 1999). Leboyer e colaboradores (1994) identificaram elevada concentração do fragmento da região do C-terminal da  $\beta$ -endorfina (20-29) no plasma de crianças com TEA. Tordjman et al. (1997) encontraram valores significativamente maiores de endorfinas e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em crianças com TEA.

Paralelamente a esses estudos, Dohan pesquisando o hábito alimentar da região das ilhas do Pacífico Sul, associou o consumo de uma dieta livre de trigo, centeio, cevada e aveia desta população com menor ocorrência de esquizofrenia e também maior prevalência de casos menos severos. Em estudos posteriores, relatou melhora do quadro clínico de esquizofrênicos submetidos à dieta isenta de glúten e/ou caseína. Alguns grupos de pesquisa concluíram que a teoria de Dohan se aplicava ao TEA (Dohan, 1966, 1983; Dohan, Grasberger, 1973; Elder, 2008).

---

<sup>4</sup> A neurochemical theory of autism - Uma teoria neuroquímica do autismo.

A teoria de sobrecarga do sistema opioide por peptídeos exógenos de origem alimentar em indivíduos com TEA e esquizofrênicos postula que a deficiência da enzima dipeptidil peptidase IV (DPPIV) e/ou outras proteases que clivam o aminoácido prolina, conduzem à produção excessiva de peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína dentro do lúmen intestinal. Relacionado a este fato o aumento da permeabilidade da parede intestinal, decorrente de diversas condições e doenças, permite a passagem dos peptídeos opioides para a corrente sanguínea. Assim, estes compostos por terem afinidade por receptores opioides e capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica desencadeiam sobrecarga do sistema opioide resultando em disfunções no cérebro e também de sistemas periféricos contribuindo para o agravamento dos sintomas do TEA e da esquizofrenia (Shattock & Whiteley, 2002; White, 2003; Elder, 2008).

Essa teoria ganhou força a partir da publicação de estudos que analisaram o perfil de compostos proteicos dos fluidos corpóreos utilizando método de filtração por gel, cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC - high performance liquid chromatography) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS - Liquid chromatography–mass spectrometry). Neles foram descritas elevadas concentrações de peptídeos e presença de exorfinas derivadas do glúten e caseína na urina de indivíduos com TEA (Reichelt et al., 1981; Shattock et al., 1990; Reichelt et al., 1997; Reichelt et al., 2012).

Shanahan et al. (2000) utilizando espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS - electrospray ionisation mass spectrometry) identificaram em urina de crianças com TEA fragmentos de  $\beta$ -casomorfina,  $\alpha$ -gliadina e outros compostos com elevado potencial biológico que não são de origem dietética. Entre eles se incluem a deltorfina, um peptídeo modulador da morfina e a dermorfina que é um potente peptídeo alucinógeno isolado na pele de anfíbio (*Phyllomedusa sauvagei*).

Em estudo mais recente, Sokolov et al. (2014) desenvolveram um método de ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) ultrassensível

para detecção e quantificação de peptídeos opioides derivados da caseína em urina. Nesse trabalho os autores identificaram elevada concentração de  $\beta$ -casomorfina 1-7 em amostras de urina de indivíduos com TEA em comparação com grupos controle e também observaram uma correlação entre concentração de  $\beta$ -casomorfina 1-7 e severidade do quadro clínico. No quadro 1 estão resumidos alguns peptídeos identificados na urina de indivíduos com TEA e suas respectivas fontes alimentares

Quadro 1- Resumo de peptídeos identificados em urina de indivíduos com TEA e sua respectiva fonte exógena de origem alimentar.

<b>Fonte alimentar</b>	<b>Nome</b>	<b>Sequência identificada em urina de crianças autistas</b>
<b>Leite</b>	$\beta$ -casomorfina 1-4	Tyr-Pro-Phe-Pro
	$\beta$ -casomorfina 1-6	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-
	$\beta$ -casomorfina 1-7	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile
	$\beta$ -casomorfina 1-8	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro
<b>Trigo</b>	$\alpha$ -gliadina 1-4	Tyr-Pro-Gln-Pro
	$\alpha$ -gliadina 1-5	Tyr-Pro-Gln-Pro-Gln
	$\alpha$ -gliadina 1-6	Tyr-Pro-Gln-Pro-Gln-Pro
	$\alpha$ -gliadina 1-8	Tyr-Pro-Gln-Pro-Gln-Pro-Phe-Pro

Fonte - Adaptado de Shanahan et al.,2000.

### 1.5.1.3- Outros compostos

Alguns compostos foram identificados em urina de crianças com TEA. Esses compostos foram associados com alterações da microbiota intestinal. O quadro 2 resume os compostos e os micro-organismos relacionados.

Quadro 2 - Resumo de compostos identificados na urina de grupo de crianças com TEA resultantes de alterações da microbiota intestinal.

Composto	Micro-organismo relacionado	Estudos
trans-indolil-3-acrililglicina	Desequilíbrio microbiota intestinal? Produção endógena?	Anderson et al. (2002)
<i>p</i> -cresol	Espécies de <i>Clostridium</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Altieri et al. (2011) Gabriele et al. (2014)
ácido 3-(3hidroxifenil) propiônico ácido 3-hidroxifenilacético ácido 3-hidroxihipúrico	Espécies de <i>Clostridium</i>	Xiong et al. (2016)

### 1.5.2- Alterações do sistema imunológico

Anormalidades da resposta imunológica foram descritas pela primeira vez em indivíduos com TEA no ano de 1977 por Stubbs e Crawford. Posteriormente, alguns grupos de pesquisa identificaram condições heterogêneas que demonstram um comprometimento de diferentes vias do sistema imunológico.

Diversos estudos em cérebros de autistas *post-mortem* relataram alterações imunológicas que caracterizam diferentes quadros de neuroinflamação. Entre os achados incluem proeminente ativação da micróglia, aumento de citocinas inflamatórias e produção de quimiocinas incluindo, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12p40 (IL-12p40), fator de necrose tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ). A elevada concentração de quimiocina C-C motif ligante (CCL)-2 foi identificada nos tecidos do cérebro e também no líquido cefalorraquidiano (Vargas et al., 2005; Li et al., 2009; Morgan et al., 2010).

O perfil de expressão gênica dos tecidos de cérebros *post-mortem* de indivíduos com TEA revelaram um aumento de níveis de transcrição do RNA mensageiro de vários genes relacionados ao sistema imune, principalmente aqueles associados aos processos de neuroinflamação (Garbett et al., 2008). Voineagu et al. (2011) observaram o padrão de transcrição de células neuronais e concluíram que a rede de co-expressão gênica reflete anormalidades da modulação cortical do cérebro de indivíduos com TEA. Esses achados foram associados com alterações da micróglia e ativação imune; sugerindo um papel causal para a desregulação imune no curso da disfunção neurológica e plasticidade da sinapse do cérebro de indivíduos com TEA.

#### **1.5.2.1- Resposta celular inata**

A resposta celular inata apresenta-se alterada em autistas. Estudos evidenciaram capacidade reduzida de células natural killer (NK) para destruir células alvo (Warren, Foster, Margaretten, 1987; Enstrom et al., 2009; Vojdani et al., 2008). Em pesquisas foram observadas atividade lítica reduzida das células NK de indivíduos com TEA e alterações de fatores que contribuem para a atividade das células NK, como perforina, granzima B e IFN- $\gamma$ . As células NK parecem produzir níveis mais altos de perforina, granzima B e IFN- $\gamma$  enquanto estão em condições de repouso em crianças com TEA (Enstrom et al., 2009). Estes dados sugerem que, *in vivo*, há um aumento da ativação das células NK, no entanto, após uma forte estimulação *in vitro*, como, por exemplo, com células alvo, as células NK de crianças com TEA são incapazes de aumentar a produção de suas moléculas efetoras, levando a redução de sua capacidade de destruir os alvos (Enstrom et al., 2009).

Os monócitos estão entre os primeiros respondentes durante a inflamação e são produtores robustos de citocinas, criando um meio de citocinas que promove a atividade das células imunes vizinhas. Os

monócitos também servem como precursores para uma série de células de linhagem mielóides específicas de tecidos, incluindo macrófagos, células dendríticas e microglia (Djukic et al., 2006; Geissmann et al., 2010). Um número aumentado de monócitos circulantes foi relatado em indivíduos com TEA (Sweeten, Posey, Mc Dougle, 2003). No estudo de Estrom et al. (2010) foi observado um padrão atípico de respostas de citocinas após estimulação agonista de receptores do tipo Toll-like - 4 (TLR) de monócitos CD14+ isolados de crianças com TEA. Especificamente, o aumento da produção de citocinas inflamatórias, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, foi observado em resposta ao ácido lipoteicoico.

#### **1.5.2.2- Resposta adaptativa**

Alterações da resposta humoral foram observadas em indivíduos com TEA. Níveis elevados de IgE, IgG foram relatados em pesquisa, evidenciando uma resposta tipo alérgica. Crianças com TEA que possuem anticorpos anti-sarampo ou anti-herpes humano também apresentaram anticorpos anti - SNC (anti- proteína básica de mielina, proteínas de neurofilamentos dos axônios), os quais não foram observados no soro de grupos controle. Contudo não está explícito se estes anticorpos podem contribuir com a patogênese do TEA. Embora não esteja claro como esses anticorpos poderiam contribuir para a patogênese do TEA, evidências provenientes de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, coreia de Sydenham e outros distúrbios neuropsiquiátricos autoimunes pediátricos associados com infecção estreptocócica (PANDAS<sup>5</sup>) mostram que a presença e título dos anticorpos anti - CNS correlacionam-se com sintomas neuropsiquiátricos (Libbey & Fujinami, 2010).

A resposta celular adaptativa também se manifesta de forma atípica em pessoas com TEA. Em diversos estudos diferentes aspectos das células

---

<sup>5</sup> O nome PANDAS foi escolhido por ser o acrônimo de: P (pediátrico, porque ocorrem em crianças), A (auto-imune), N (neuropsiquiátrico), D (doença), A (associada) e S (Streptococcus).



T foram observados. Gupta et al. (1998) identificaram uma predominância da produção de IL-4 e IFN- $\gamma$  na população de células T CD4+ circulante em indivíduos com TEA. A análise da produção de citocinas intracelulares mostrou aumento na produção de TNF- $\alpha$ , mas reduzida de IL-10 de células T presentes no tecido periférico e mucosa intestinal de crianças com TEA. Esta tendência para um fenótipo de resposta TH2 elevada e TH1 reduzida foi relatada em diferentes estudos (Ashwood et al., 2004).

O perfil de ativação de fenótipos de células T circulantes também foi diferente em células T CD3+ de pessoas com TEA. Essas células apresentam níveis mais altos de antígeno leucocitário humano classe II DR, um marcador de ativação celular tardia (Ashwood et al., 2011a; Ashwood et al., 2011b). O aumento da ativação das células T também pode ser associado à diminuição da apoptose levando à sobrevivência de células ativadas que seriam eliminadas. Essa característica já foi descrita em condições inflamatórias crônicas tais como doença de Crohn (Monteleone et al., 2006; Ashwood et al., 2011a).

As alterações crônicas da resposta imunológica podem constituir um endofenótipo para indivíduos com TEA. Explorando essa hipótese, Saresella et al. (2009) estudaram crianças com TEA e seus irmãos saudáveis em comparação com crianças neurotípicas. Os resultados demonstraram que crianças com TEA e seus irmãos saudáveis apresentavam desregulação imune similar. Esse resultado sugere que alterações do sistema imune podem constituir um endofenótipo, contudo, mecanismos genéticos e epigenéticos ainda são desconhecidos e precisam ser investigados.

### **1.5.2.3- Biomarcadores urinários relacionados ao sistema imunológico**

Atualmente existem poucos estudos publicados, os quais identificaram compostos candidatos à biomarcadores relacionados com alterações do sistema imunológico presentes em urina. Isso se deve ao fato

de que a maioria dos estudos investigou células do sangue e tecidos de cérebro *post mortem*.

A neopterina, 2-amino-4-hidroxi-6-(D-eritro-1',2'3'- trihidroxipropil)-pteridina, é uma pteridina gerada durante diversos processos inflamatórios, incluindo os neuroinflamatórios. O aumento da produção e liberação de neopterina é regulado transcricionalmente por concentrações de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , fator de crescimento do nervo (NGF) e peróxido de hidrogênio (D'Sa et al., 1996; Bauer et al., 2002; Franscini et al., 2003; Ishii et al., 2005). Esse metabólito ganhou grande importância nas síndromes psiquiátricas e neurodegenerativas quando foram observadas concentrações aumentadas em líquido cefalorraquidiano e sangue de indivíduos acometidos por essas doenças (Ota et al., 2007; Chittiprol et al., 2010; Hagberg et al., 2010).

Esse composto foi o primeiro metabólito identificado em urina de portadores de TEA que tem uma relação com alterações do sistema imunológico. Três estudos avaliaram a concentração de neopterina em crianças com TEA comparados com controles. Messahel et al. (1998) relataram níveis significativamente mais altos de neopterina nas amostras de urina (sem pré-tratamento oxidativo) de crianças com TEA quando comparadas com amostras de crianças do grupo controle. Harrison e Pheasant (1995) obtiveram resultado semelhante, mas quando submetem as amostras de urina a um pré-tratamento com oxidantes, no entanto, descobriram que os níveis de neopterina entre crianças com TEA e controles não foram significativamente diferentes. Em contraste, na pesquisa de Eto, Bandy e Butterworth (1992), na qual o pré-tratamento oxidativo foi empregado, encontraram menor concentração de neopterina urinária em crianças com TEA em comparação com crianças neurotípicas.

Com o advento da proteômica e metabolômica novos compostos foram identificados. Yang et al. (2016) analisaram amostras de urina de oito indivíduos com TEA e oito controles pareados por idade e sexo. As amostras passaram por marcação isobárica para a quantificação absoluta e relativa, em seguida, foram submetidas a um protocolo de análise de espectrometria

de massa. No estudo as principais proteínas identificadas, as quais, as concentrações estavam aumentadas em indivíduos com TEA em comparação com o grupo controle tinham relação com processos inflamatórios e alterações do TGI como, por exemplo, a alfa-1-glicoproteína ácida e alfa-2-glicoproteína rica em leucina.

### **1.5.3- Alterações de vias metabólicas**

Na definição do TEA não existe qualquer citação sobre ocorrência de alterações metabólicas, mas a prevalência de biomarcadores metabólicos anormais é de 30% em crianças com TEA (Cheng, Rho, Masino, 2017). Diferentes alterações metabólicas foram identificadas entre elas destacam-se alterações relacionadas aos aminoácidos e creatina.

#### **1.5.3.1- Biomarcadores urinários relacionados a alterações metabólicas – creatina**

A creatina é um composto que desempenha um papel importante na transmissão e estoque de energia em células de tecidos com grande demanda de energia. Os tecidos como a retina, cérebro, espermatozoide, músculo esquelético e cardíaco contêm elevada concentração da enzima creatina quinase (CK), que catalisa a fosforilação reversível da creatina pelo trifosfato de adenosina (ATP) gerando difosfato de adenosina (ADP) e fosfocreatina. Quando ocorrem demandas energéticas, a CK catalisa a transferência do grupo fosfato da fosfocreatina para o ADP restaurando reservas de ATP e creatina (Wallimann, 1994; Verhoeven, Salomons, Jakobs, 2005).

A manutenção do *pool* de creatina é feita por meio da ingestão de alimentos de origem animal e produção endógena que ocorre primariamente nos rins, pâncreas e fígado. A biossíntese da creatina envolve a ação das enzimas L-arginina:glicina amidinotransferase (AGAT, EC 2.1.4.1) e S-

adenosil-L-metionina:N-guanidinoacetato metiltransferase (GAMT. EC 2.1.1.2) que sintetizam a creatina a partir de unidades de aminoácidos: glicina, L-arginina e metionina. A enzima AGAT catalisa a transferência do grupo amidino da arginina para glicina produzindo ornitina e guanidinoacetato (GAA). A enzima GAMT promove a transferência reversível do grupo metil da S-adenosil-L-metionina para o GAA originando creatina S-adenosil-L-homocisteína (Wallimann et al., 1992; Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000; Verhoeven, Salomons, Jakobs, 2005).

Vários tecidos do corpo contêm o transportador de creatina SLC6A8 dependente de sódio e cloro, que transfere a creatina através da membrana plasmática contra um gradiente de concentração de aproximadamente 50µmol/L no plasma para mais de 40mmol/L no meio intracelular (Stromberger, Bodamer, Stockler-Ipsiroglu, 2003). Desta forma, tecidos com pouca ou nenhuma síntese de creatina têm suas necessidades supridas pela ação desse transportador (Verhoeven, Salomons, Jakobs, 2005). A creatina e fosfocreatina são convertidas enzimaticamente a uma taxa relativamente constante (1,5% a 1,7% ao dia) em creatinina, que se difunde passivamente através da membrana celular para fora da célula e é excretada pelos rins por meio da urina (Schulze, 2003; Verhoeven, Salomons, Jakobs, 2005).

Pesquisas identificaram erros inatos do metabolismo decorrentes do comprometimento da função das enzimas AGAT e GAMT que estão envolvidas na biossíntese de creatina assim como a proteína responsável por seu transporte, a SLC6A8 que coletivamente constituem as síndromes de deficiência de creatina (CDS - Creatine deficiency syndrome) (Salomons et al., 2001; Salomons et al., 2003; Stromberger, Bodamer, Stockler-Ipsiroglu, 2003; Comeaux et al., 2013).

As apresentações clínicas das CDS são variáveis e comprometem a função do SNC. Os sintomas não são específicos e incluem atraso do desenvolvimento, declínio cognitivo, deficiência intelectual, prejuízo da fala e linguagem, elevada atividade epiléptica, epilepsia refratária, síndromes de movimento extrapiramidal e comportamento autista (Schulze, 2013).

As CDS conduzem a depleção da creatina/ fosfocreatina no cérebro. O sistema creatina-fosfocreatina desempenha um papel essencial da homeostase da energia celular do SNC. Esse sistema atua como uma fonte de energia espacial e temporal, participa da transdução de energia e desempenha uma função importante na regulação de energia celular (Wallimann et al., 1992). Estudos indicaram também sua ação no processo de alongamento dendrítico e axonal e no crescimento do cone de migração do neurônio (Wang, Esbensen, Bentley, 1998; Braissant & Henry, 2008). Esse sistema desempenha ainda um papel fundamental na proteção do SNC em processos neurodegenerativos como nas doenças de Parkinson e Huntington (Andres et al., 2005ab).

O comum denominador dessas alterações metabólicas é a virtual e completa ausência de creatina e fosfocreatina no cérebro que pode ser observada *in vivo* por espectroscopia de ressonância magnética (MRS - magnetic resonance spectroscopy). O diagnóstico também pode ser feito a partir de uma amostra de urina ou sangue, por meio da determinação da concentração de creatina e GAA (Stöckler et al., 1994; Schulze et al., 1997; Schulze, 2013). A determinação da concentração de creatinina em urina pode ser considerada um método simples e rápido para a detecção de defeitos da biossíntese de creatina, uma vez que a excreção de creatinina reflete diretamente o *pool* intracelular de creatina.

Whiteley et al. (2006) identificaram baixa concentração de creatinina em amostras de urina de crianças com TEA (n=24) quando comparadas com amostras do grupo controle formado por crianças neurotípicas (n=50). Wang et al. (2009) em pesquisa posterior também obtiveram resultado semelhante.

### **1.5.3.2- Biomarcadores urinários relacionados a alterações metabólicas - aminoácidos**

Os aminoácidos atuam como precursores de coenzimas, hormônios, ácidos nucleicos e outras moléculas essenciais para o funcionamento do

organismo. O perfil de aminoácidos no plasma e na urina tem sido usado para elucidar um número crescente de desordens metabólicas desde a introdução de métodos de cromatografia por meado de 1945 (Bradley & Feinerman, 2003). Várias linhas de pesquisas mostraram que mudanças na disponibilidade, metabolismo e /ou atividade de receptores dos aminoácidos neuroativos associados às funções do SNC podem desempenhar um papel na patogênese e / ou na farmacoterapia de vários distúrbios psiquiátricos que apresentam sintomas, como deficiência cognitiva e problemas de interação social (Zheng et al., 2017).

A identificação de variações na concentração de serotonina, catecolaminas e neurotransmissores opioides em líquido cefalorraquidiano, plasma e urina de indivíduos com TEA conduziram ao estudo de alterações no metabolismo dos aminoácidos que participam da neurotransmissão como o glutamato, glutamina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, glicina, fenilalanina e histidina. Os resultados dos estudos publicados sobre concentração desses aminoácidos em urina de crianças com TEA são divergentes (Young et al., 1978; Reichelt et al., 1981; Gillberg, Terenius, Lonnerhom, 1985; Reichelt et al., 1997; Dhossche et al., 2002; Shinohe et al., 2006; Tirouvanziam et., 2012).

A arginina é um precursor essencial para a síntese de proteínas e óxido nítrico. Esse aminoácido pode poupar a glutamina, desintoxicar amônia e aumentar o fluxo sanguíneo cerebral (Good, 2011). Comparado com grupo controle, o nível de arginina no plasma de pacientes com TEA foi reportado como elevado.

A leucina, isoleucina e valina são denominados aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e coletivamente representam aproximadamente 33% de todos os aminoácidos do corpo. Uma grande proporção desses três aminoácidos é encontrada no músculo esquelético, onde atuam como um elemento estrutural e reserva de nitrogênio sistêmico (Cole, 2015). Eles possuem a característica de atravessarem a barreira hematoencefálica mais facilmente que outros aminoácidos e também participam de forma direta

como também indireta em uma variedade de funções bioquímicas importantes no cérebro. Entre essas funções incluem: síntese de proteínas, produção de energia, compartimentalização do glutamato e síntese dos neurotransmissores serotonina, dopamina e norepinefrina, que são derivados dos aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina (Nellis et al., 2003; Fernstrom, 2005).

Arnold et al. (2003) relataram baixos níveis dos aminoácidos essenciais, valina, leucina e lisina no plasma de pacientes com TEA em comparação com grupo controle formado por indivíduos neurotípicos. Embora haja uma escassez de estudos sobre os níveis de aminoácidos de cadeia ramificada em líquido corpóreo de indivíduos com TEA, a maioria dos resultados aponta para uma redução dos níveis desses compostos em urina (Evans et al., 2008). Os resultados de estudos de outros aminoácidos que não foram relatados na revisão estão resumidos no quadro 3. Apesar da identificação de diferentes concentrações de aminoácidos em urina de pessoas com TEA, ainda não está claro o papel que desempenham sobre o quadro clínico, tornando necessário o desenvolvimento de mais estudos para estabelecer uma conexão entre esses compostos e a síndrome.

Quadro 3 - Resumo de resultados de estudos que determinaram a concentração de aminoácidos em urina de indivíduos com TEA.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Concentração em urina de autistas</b>	<b>Estudo</b>
Alanina	↑ ↓	Nadal-Desbarats et al. 2014; Noto et al. 2014 Evans et al. 2008; Ming et al. 2012
Ácido aspapártico	↓	Evans et al. 2008
Histidina	↓	Evans et al. 2008; Ming et al. 2012; Nadal-Desbarats et al. 2014
Homocisteína	↓	Noto et al. 2014; Puig-Alcaraz et al. 2015

(continuação)

Aminoácidos	Concentração em urina de autistas	Estudo
Alanina	↑	Nadal-Desbarats et al. 2014; Noto et al. 2014
	↓	Evans et al. 2008; Ming et al. 2012
Ácido aspapártico	↓	Evans et al. 2008
Histidina	↓	Evans et al. 2008; Ming et al. 2012; Nadal-Desbarats et al. 2014
Homocisteína	↓	Noto et al. 2014; Puig-Alcaraz et al. 2015
Lisina	↑	Noto et al. 2014
Prolina	↓	Evans et al. 2008
Serina	↓	Evans et al. 2008; Ming et al. 2012
Taurina	↑	Yap et al. 2010; Nadal-Desbarats et al. 2014
	↓	Ming et al. 2012
Tirosina	↑	Noto et al. 2014
	↓	Evans et al. 2008
Treonina	↓	Evans et al. 2008

↑ elevada concentração em urina quando comparada com grupo controle

↓ baixa concentração em urina quando comparada com grupo controle

Fonte - Adaptado de Zheng et al., 2017.

De acordo com o que foi apresentado, perfis metabólicos alterados em urina de indivíduos com TEA devem ser investigados, pois dispõe do potencial de elucidar importantes alterações biológicas subjacentes, que podem possibilitar um diagnóstico simples e objetivo de subtipos de TEA e facilitar o desenvolvimento de terapias direcionadas, e consequentemente promover maior individualização de decisões e também permitir o monitoramento de tratamentos dos indivíduos com TEA.



# *Objetivos*



## **2- Objetivos**

### **2.1- Objetivo geral**

Determinar metabólitos em amostras de urina de crianças com TEA e comparar com amostras de urina do grupo controle com a finalidade de identificar perfil metabólico específico para indivíduos com TEA.

### **2.2- Objetivos específicos**

- Determinar a concentração total de proteína das amostras de urina de crianças com TEA e grupo controle;
- Quantificar a concentração de creatinina das amostras de urina de crianças com TEA e grupo controle;
- Analisar a composição de aminoácidos das amostras de urina de crianças com TEA e grupo controle;
- Identificar compostos proteicos que possam estar relacionados com TEA por meio da análise de amostras de urina de crianças com TEA e grupo controle a partir de eletroforese;
- Detectar compostos que possam estar relacionados com TEA a partir da análise de amostras de urina de crianças com TEA e grupo controle por espectrometria de massa;
- Caracterizar por meio da análise proteômica os compostos de frequência relevante identificados em amostras de urina por método de espectrometria de massa.

*Casuística*  
*Material e Métodos*



### 3- Casuística, material e métodos

#### 3.1- Delineamento e período de estudo

Estudo transversal prospectivo, de desenho caso-controle, desenvolvido pelo Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. As atividades tiveram início em dezembro de 2014 e foram encerradas em novembro de 2017. Foi realizada amostragem não probabilística onde entraram na amostra final dos casos crianças com TEA do sexo masculino que tinham consentimento de pais ou responsáveis legais para participar do projeto de pesquisa e que preenchiam os critérios de inclusão do estudo. O número de participantes do grupo controle foi o mesmo devido à metodologia do estudo.

#### 3.2- Casuística

Os casos estudados foram crianças (n=22) do sexo masculino com diagnóstico de TEA na faixa etária de 3 a 10 anos e grupo controle constituído por crianças com desenvolvimento típico, pareadas por sexo e idade. A figura 4 resume as características dos grupos observados no estudo.



##### **Caso**

Crianças com TEA (n= 22)

Sexo: masculino

Idade: 3 - 10 anos



##### **Grupo controle pareado por sexo e idade**

Crianças neurotípicas (n= 22)

Sexo: masculino

Idade: 3 - 10 anos

Figura 4 - Características dos casos e grupo controle.

### **3.2.1- Triagem dos participantes**

A triagem das crianças com TEA foi realizada no Centro de Especialização Municipal do Autista situado na cidade de Limeira - SP e na Associação de Pais e Amigos do Autista da Baixa Mogiana - Fonte Viva localizada na cidade de Mogi - Guaçu - SP. As crianças participantes foram inicialmente diagnosticadas por psiquiatras e pediatras e encaminhadas para as instituições citadas. Nesses locais o diagnóstico foi confirmado por equipe multidisciplinar de acordo com critério da CID 10. Os pais e responsáveis legais foram convidados para participar de uma reunião nas instituições. Nas reuniões foi apresentado o projeto e feita leitura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo II). As dúvidas sobre a participação dos voluntários, etapas do projeto e procedimentos empregados foram elucidadas.

A captação de participantes do grupo controle formado por crianças com desenvolvimento típico foi feita em cinco escolas (Centro Infantil - Lucinda Tank Kühl, E.M.E.I.E.F- Pastor Ismael Pereira do Lago, E.M.E.I.E.F- Maria Aparecida Machado Julianelli, E.M.E.I.E.F- Profº Noedir Tadeu Santini, E.E Leontina Silva Busch) e uma instituição religiosa (Dispensário Madre Teresa de Calcutá) da cidade de Limeira - SP. Em primeiro momento, foi realizado contato com o responsável de cada instituição e feita apresentação do projeto de pesquisa. Os diretores de todas as instituições entraram em contato com os responsáveis legais de possíveis participantes. Em visita domiciliar ou reunião nas instituições o projeto foi apresentado e realizada a leitura do TCLE (Anexo III). As dúvidas sobre a participação dos voluntários, etapas do projeto e procedimentos empregados foram elucidadas.

### **3.2.2- Critérios de inclusão e exclusão dos participantes com TEA**

Os critérios de inclusão foram: ser do sexo masculino, idade na faixa etária de 3 a 10 anos e vínculo das crianças com TEA com as instituições participantes. Esse critério permitiu o controle de duas variáveis. A primeira

foi garantir um diagnóstico homogêneo, uma vez que as instituições elegeram procedimentos semelhantes e a segunda de que as intervenções psicopedagógicas adotadas são equivalentes. Ambas as instituições compartilham de atividades que associam o método de tratamento e educação para autistas e crianças com déficits relacionados com a comunicação (TEACCH - Treatment and Education of Autistic and Related Communication-handicapped Children) e análise do comportamento aplicada (ABA - Applied Behavior Analysis). Os critérios de exclusão empregados às crianças com TEA foram: não participar do tratamento das instituições selecionadas, ser adepto de qualquer intervenção nutricional, portar doença celíaca e alergia ou intolerância ao leite de vaca, e ter doença diagnosticada que comprometa o metabolismo e excreção de nutrientes como doenças hepáticas e renais.

### **3.2.3- Critério de inclusão e exclusão dos participantes do grupo controle de crianças com desenvolvimento típico pareados por sexo e idade**

Os critérios de inclusão foram: ter desenvolvimento típico, ser do sexo masculino e possuir idade equivalente de uma criança com TEA participante. Os critérios de exclusão foram: ser adepto de qualquer intervenção nutricional, apresentar doença neuropsiquiátrica, portar doença celíaca e alergia ou intolerância ao leite de vaca, e ter doença diagnosticada que comprometa o metabolismo e excreção de nutrientes como doenças hepáticas e renais.

### **3.2.4- Aspectos Éticos**

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução criada pelo Conselho Nacional de Saúde nº 466 (2012). O presente projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/12/2011 e aprovado com número de protocolo 449/11 (Anexo I).

### **3.5- Material e Métodos**

#### **3.5.1- Material**

A lista contendo os materiais e equipamentos utilizados nas análises está disposta no anexo IV.

#### **3.5.2- Métodos**

##### **3.5.2.1- Coleta de amostras de urina**

Os responsáveis pelos portadores de TEA e crianças com desenvolvimento típico receberam orientações antes da coleta das amostras. As orientações foram passadas pela pós - graduanda, com auxílio dos responsáveis técnicos e coordenadores das instituições participantes.

O procedimento foi realizado em domicílio. A primeira urina do dia foi coletada e acondicionada em coletor universal estéril. As amostras foram entregues em pontos de recebimento, acondicionadas em recipiente com gelo seco, transportadas para o Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan e armazenadas em temperatura de - 80 °C.

##### **3.5.2.2- Descongelamento e fracionamento das amostras de urina**

As amostras foram descongeladas de forma lenta em temperatura de 4 °C, homogeneizadas, filtradas em filtro de PVDF 45 µm e fracionadas em volumes distintos. Duas alíquotas de 2,0 mL foram liofilizadas e designadas para análise de espectrometria de massa e proteômica. O

volume restante foi subdividido em frações de 1,5 mL e direcionado para as análises que foram feitas e serão descritas na sequência. As amostras após novo fracionamento foram estocadas a temperatura de - 80 °C até o momento do experimento. Abaixo a figura 5 mostra o fluxo do fracionamento das amostras.

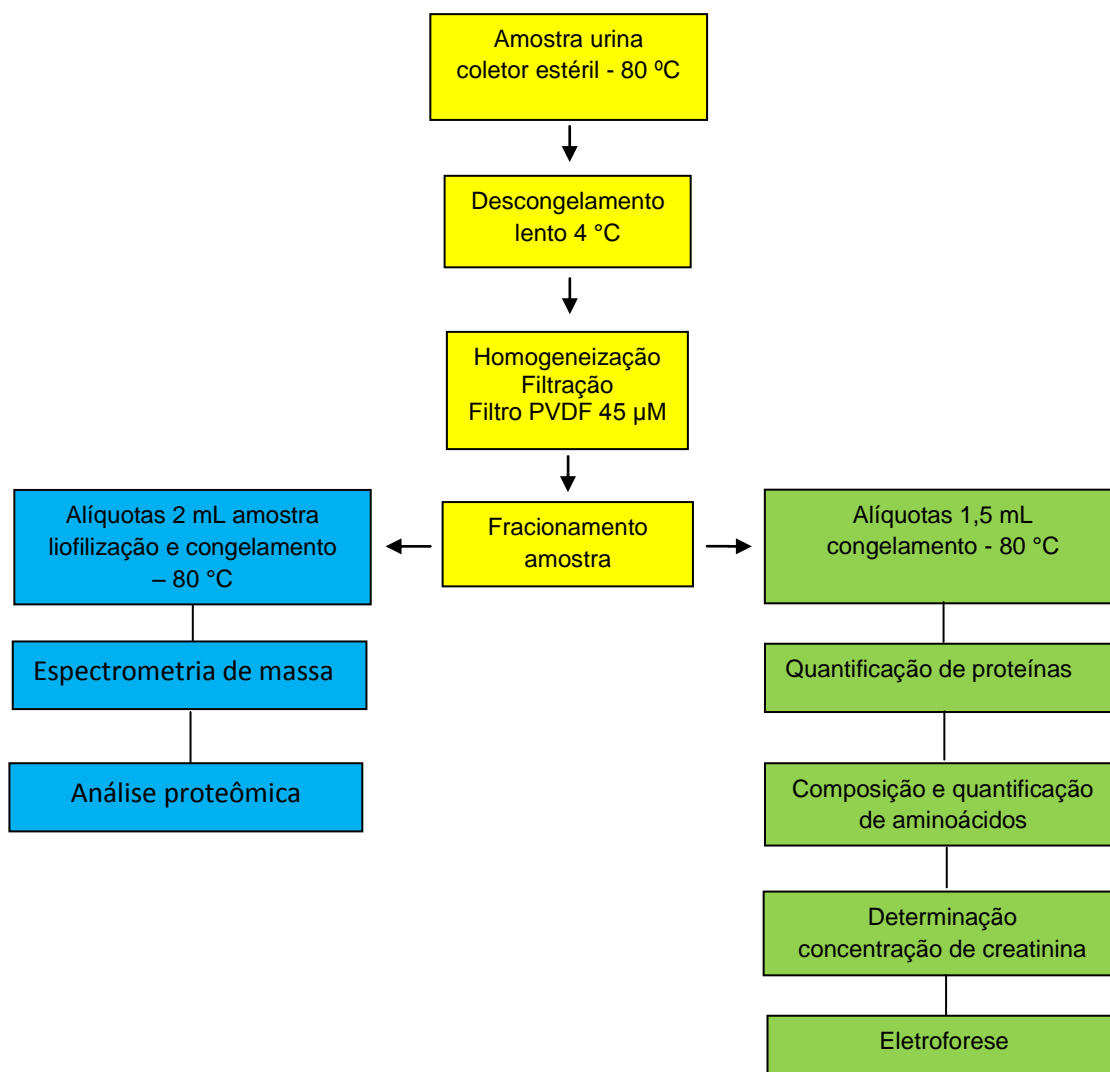


Figura 5 - Fluxograma fracionamento das amostras de urina armazenadas em coletores a temperatura de - 80 °C.



### **3.5.2.3- Quantificação de proteínas método de Bradford**

A dosagem da concentração de proteínas totais foi realizada por meio do método de Bradford (1976). O kit BioRad protein assay (BioRad®) foi empregado na análise. A soroalbumina bovina (BSA) foi adotada como padrão de referência. O reagente de Bradford concentrado foi diluído em água Milli-Q (1:4). Posteriormente, a cada poço de uma placa de microtitulação foram adicionados 10  $\mu$ L da amostra ou solução padrão a serem dosados e 200  $\mu$ L do reagente de Bradford. A preparação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A concentração das amostras foi estimada através da comparação com curva padrão de BSA (1,0 - 0,8 - 0,6 - 0,4 - 0,2 - 0,1 - 0,05 mg/mL), plotada e analisada por regressão linear. A leitura foi realizada por espectrofotômetro a 595nm.

### **3.5.2.4- Separação e determinação da composição de aminoácidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)**

Em frascos tipo vials foram adicionados 40  $\mu$ l de amostra e 30  $\mu$ l da solução derivatizante (etanol 70% v/v, água Milli-Q 10% v/v, trietilamina 10% v/v e fenilisotiocianato 10% v/v), em seguida homogeneizados e deixados em espera à temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente 170  $\mu$ l de água Milli-Q foi adicionado. Para a análise de cromatografia o volume de injeção foi de 50  $\mu$ L e a detecção ocorreu através de comprimento de onda de 254 nm. As condições de operação adotadas estão detalhadas no quadro 4.

A quantificação dos aminoácidos foi determinada com base no tempo de retenção e área do pico obtida das concentrações conhecidas dos aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, tirosina, valina, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, fenilalanina e lisina. A fórmula geral para o cálculo segue abaixo:

(1)

$\frac{\text{área aminoácido amostra} \times \text{concentração aminoácido padrão}}{\text{aminoácido do padrão}} =$

Concentração  
aminoácido  
amostra

Quadro 4 - Condições cromatográficas separação e determinação da composição de aminoácidos de amostras de urina por CLUE.

Parâmetro	Descrição			
<b>Coluna</b>	Coluna C <sub>18</sub> 250mm x 4.6.7µm			
<b>Solução tampão</b>	Ajuste pH 6.4 com ácido acético glacial 100% e filtrar. Solução tampão - Acetato de sódio 19 gr + Água Milli-Q 1000 mL + Trietilamina 0,5 mL + Solução de EDTA 200µL (pH 8,0).			
<b>Fase móvel A</b>	470 mL solução tampão + 30 mL de ACN			
<b>Fase móvel B</b>	400mL ACN + 100µl solução de EDTA (pH 8,0)			
<b>Volume de Injeção</b>	50 µl			
<b>Fluxo</b>	0,3 mL/mim			
<b>Detector PDAUV – Vis</b>	254nm			
<b>Temperatura amostra</b>	8°C			
<b>Temperatura coluna</b>	38°C			
<b>Gradiente</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>% Fase móvel A</b>	<b>% Fase móvel B</b>	<b>Fluxo mL/min</b>
	0	46	54	0,3
	25 – 30	46 – 100	54 – 0	0,3
	31 – 37	100	0	0,3
	38 – 46	100	0	0,4
	47	0	100	0,3

### **3.5.2.5- Determinação de creatinina método cinético da reação de Jaffé**

A determinação da concentração de creatinina foi realizada pelo método cinético da reação de Jaffé. O método tem como princípio a reação da creatinina com ácido pícrico em meio alcalino para formar um cromóforo amarelo avermelhado. O kit comercial Creatinine (Laborlab Ltda®) foi utilizado para a análise. O método indicado pelo fabricante sofreu adaptações para leitura no espectrofotômetro. A princípio em poços de placa de microtitulação foram adicionados 25 µL de amostras diluídas em água Milli-Q (1:50), água Milli-Q (branco) e solução padrão com 250 µL do reagente de trabalho (4 partes solução A: ácido pícrico 12,7 mmol/L e laurilsulfato de sódio 8,4 mmol/L + 1 parte solução B: borato 53 mmol/L e hidróxido de sódio 970 mmol/L). Logo após a homogeneização a preparação foi imediatamente incubada à temperatura de 25°C, depois de 30 segundos a absorbância foi aferida, prosseguindo com a incubação a absorbância foi medida novamente aos 5 minutos. A leitura espectrofotométrica foi feita em comprimento de onda de 515nm e a determinação da concentração de creatinina realizada a partir do conhecimento da absorbância da solução padrão de creatinina (2,0 mg/dL).

### **3.5.2.6- Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

As proteínas também foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Laemmli, 1970). Para a análise os géis de poliacrilamida foram preparados, apresentando um gel de empacotamento na concentração de 5% e gel de corrida de 12,5%. As amostras foram diluídas em tampão de amostras redutor (350 mM de Tris/HCl; 10% de SDS; 30% de glicerol; 1,2 mg de azul de bromofenol; 9,3% de 2-mercaptoetanol) na proporção de 1:4 e aquecidas em banho seco (100 °C) por 5 minutos. Logo depois, 12 µL da amostra diluída e 5 µL de solução dos padrões de massa relativa foram aplicados em cada poço do gel.

A corrida foi realizada utilizando-se uma corrente constante de 110 volts durante 150 minutos. Após a corrida eletroforética os géis foram corados por imersão em solução de Coomassie Blue R-250 overnight. No dia seguinte, a descoloração do gel foi feita por imersão em solução de ácido acético 10% (v/v), metanol 10% (v/v) e água Milli-Q 80% (v/v). Várias trocas desta solução foram efetuadas até que ocorresse a observação nítida das bandas. Os géis foram armazenados em recipientes contendo água Milli-Q. Para as análises de eletroforese SDS-PAGE foi utilizado como padrão um marcador de massa molecular (10-250 kDa) que foi adquirido da Bio-Rad® (Precision Plus Protein Unstained Protein Standards).

#### **3.5.2.7- Análise por espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser e análise por tempo de vôo (MALDI-TOF)**

Com a finalidade de tentar identificar compostos relacionados às alterações metabólicas, uma alíquota de 2 mL de urina dos grupos controles, e de pacientes com TEA foi liofilizada. Em seguida, ressuspendido em 500 µL de solução 0,1% de TFA, dessalinizada e concentrada com o uso de ponteiros do tipo Zip Tip C18. Ao término desta etapa um volume final de 7 µL foi obtido para cada amostra.

Logo, 2 µL de cada amostra foi co-cristalizada com 2 µL do ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (solução supersaturada diluída em 50% ACN / 0,1 % TFA - matriz) e depositada sobre o amostrador. As amostras foram analisadas no modo linear positivo, compreendendo um intervalo de 400 - 5000 massa/carga (m/z), mantendo-se a potência do laser fixa em 61%. Antes da obtenção dos dados, o aparelho foi previamente calibrado utilizando-se o kit MALDI TOFMIX TM (LaserBio Labs®), sendo que a cada seis amostras, o aparelho era novamente calibrado.

### 3.5.2.8- Análise proteômica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

Para a análise proteômica as amostras foram processadas de acordo com o protocolo empregado para espectrometria de massa. Os materiais oriundos da digestão por tripsina foram analisados através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), utilizando um sistema UFLC binário acoplado ao espectrômetro de massas do tipo Electrospray - Ion Trap - Time of Flight (ESI-IT-TOF). Para as análises por LC-MS, as amostras foram ressuspensas em água / 0,1% Ácido Acético e analisadas em uma coluna C18 (Discovery C18, 5  $\mu$ m, 50 mm x 2.1 mm), tendo como solventes (A) Ácido Acético / água (0,1% v/v, 99,9% v/v) e (B) Ácido Acético / ACN / água (0,1% v/v, 90% v/v, 99,9% v/v). Por meio de um fluxo constante de 0,2 mL/min, o gradiente variou de 0 a 40% de solvente B, durante 35 minutos, a 37 °C, e monitorado a 214 nm por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA.

Seguida a etapa cromatográfica, foram realizadas as análises por espectrometria de massas, de acordo com os seguintes parâmetros: a voltagem utilizada da interface foi de 4,5 KV e a voltagem do detector, 1,8 KV, com temperatura de 200 °C; a fragmentação foi causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia; os espectros MS foram adquiridos no modo positivo e coletados na faixa de 350 - 1400 m/z; os íons entre 390 - 1400 m/z foram selecionados automaticamente para serem fragmentados; os espectros MS/MS foram coletados na faixa de 50 - 1950 m/z.

O padrão de fragmentação para cada amostra foi processado pelo programa Peaks Studio V7 (MA et al., 2003) e para sequenciamento “*de novo*” e análises proteômicas e de comparação de sequências as buscas foram feitas contra o banco de dados SwissProt (taxonomy: Homo sapiens - human) (taxon identifier: 9606).

### 3.5.2.9- Análise estatística

As informações foram digitadas em planilha eletrônica utilizando o programa Microsoft® Excel. A análise estatística foi realizada através do Programa Bioestat, versão 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá). A análise descritiva do perfil de idade dos grupos de participantes, das concentrações de creatinina, proteína e aminoácidos foram apresentadas como mediana com intervalo interquartil. Para verificar a normalidade dos dados foi utilizado o teste Shapiro-Wilk, em seguida, para a análise da diferença entre as medianas das concentrações dos compostos analisados foi empregado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Para diferenças significativas consideraram-se os valores de  $p \leq 0,05$ . A análise descritiva com o fornecimento das frequências absolutas e relativas foi empregada para expressar os resultados da análise de eletroforese em gel de SDS-PAGE, espectrometria de massa MALDI-TOF e análise proteômica por LC/MS.

*Resultados*



## 4- Resultados

### 4.1- Caracterização da população

A mediana da idade do grupo de crianças com TEA foi de 7 anos (IQR, 6.0 - 7.7) e do grupo controle formado por crianças neurotípicas também foi observada mediana de 7 anos (IQR, 6.0 - 8.0). A figura 6 ilustra a estatística descritiva.

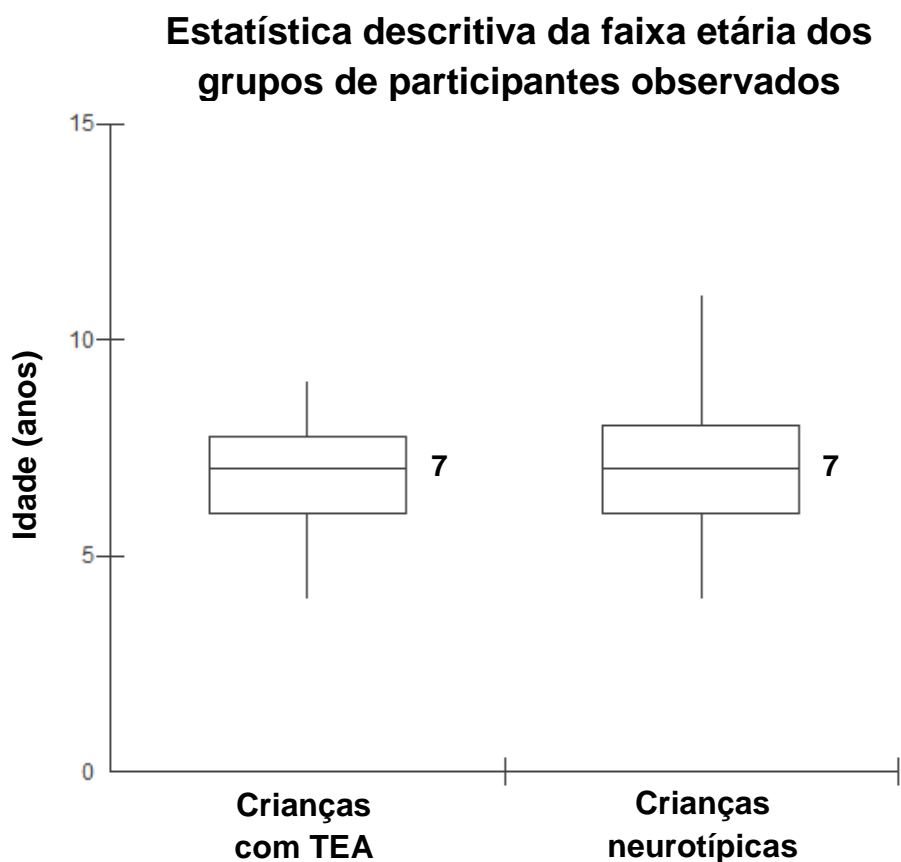


Figura 6 - Gráfico Box Plot ilustra a mediana da faixa etária dos grupos de participantes avaliados.

### 4.2- Resultado quantificação de proteínas método de Bradford

A mediana da concentração de proteína presente em urina do grupo de crianças com TEA foi de 7.95 mg/mL (IQR, 6.30 - 12.60) e do grupo controle formado por crianças neurotípicas 24.00 mg/mL (IQR, 13.25 -



53.35). A análise de comparação entre as medianas da concentração de proteína em amostras de urina (mg/mL) dos grupos de participantes demonstra diferença estatística entre crianças com TEA e crianças neurotípicas. A concentração de proteína em amostras de urina do grupo de crianças neurotípicas é significativamente superior a observada em crianças com TEA. A figura 7 ilustra a dispersão dos valores da concentração de proteína nas amostras de urina com respectivos valores de mediana dos grupos de participantes.

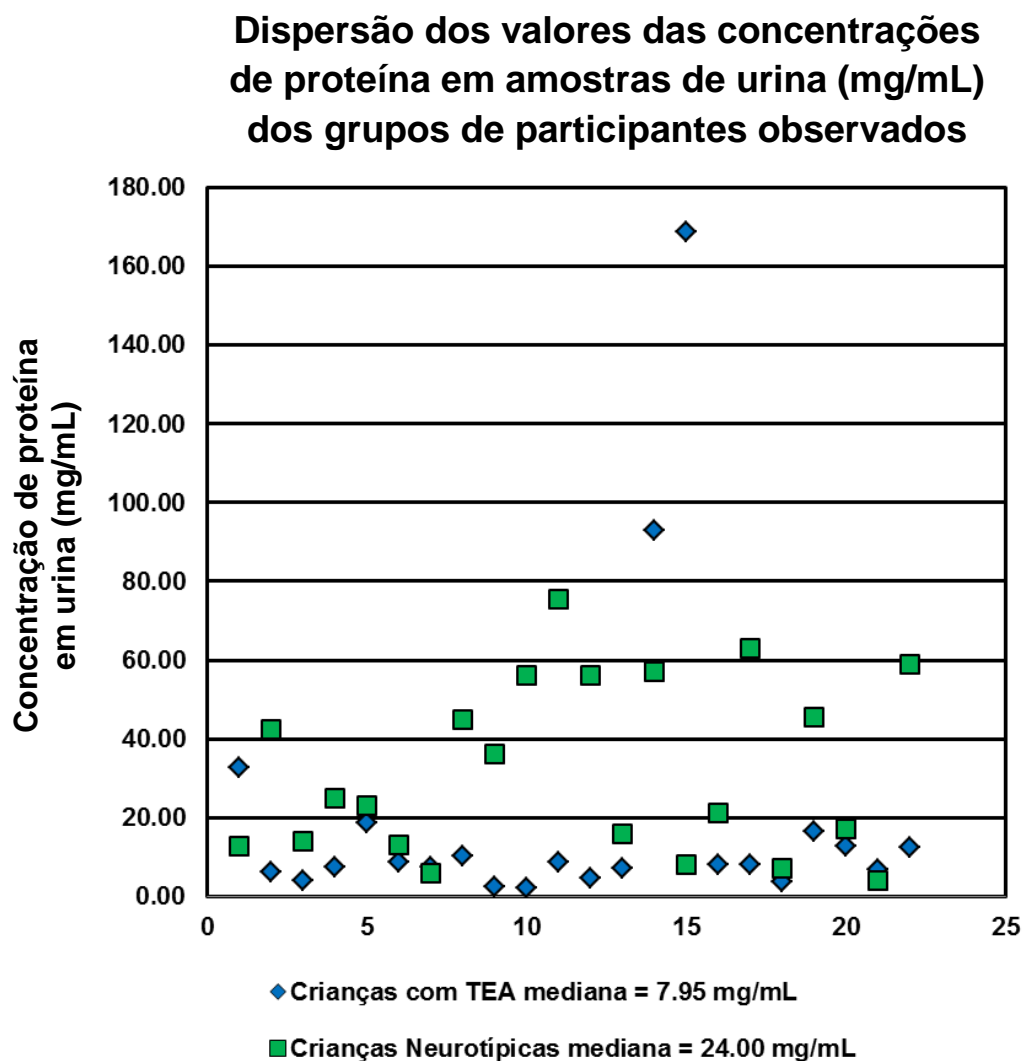


Figura 7 - Gráfico de dispersão das concentrações de proteína em amostras de urina dos grupos observados com respectivos valores de mediana. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Valor de  $U = 114.50$  e  $p = 0.0014$ .

### 4.3- Separação e determinação da composição de aminoácidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

Na análise foram identificadas diferenças intergrupos para oito aminoácidos. As amostras de urina de crianças com TEA apresentaram maior concentração dos aminoácidos arginina, glicina, leucina e treonina do que amostras do grupo controle. A concentração dos aminoácidos ácido aspártico, alanina, histidina e tirosina em amostras de urina de crianças com TEA foi inferior à observada em amostras de urina de crianças neurotípicas. A figura 8 ilustra o perfil cromatográfico dos aminoácidos presentes em amostra de urina de participantes avaliados, a tabela 1 resume o resultado de todos os aminoácidos observados e a figura 9 demonstra a dispersão das concentrações dos aminoácidos com resultados significativos.

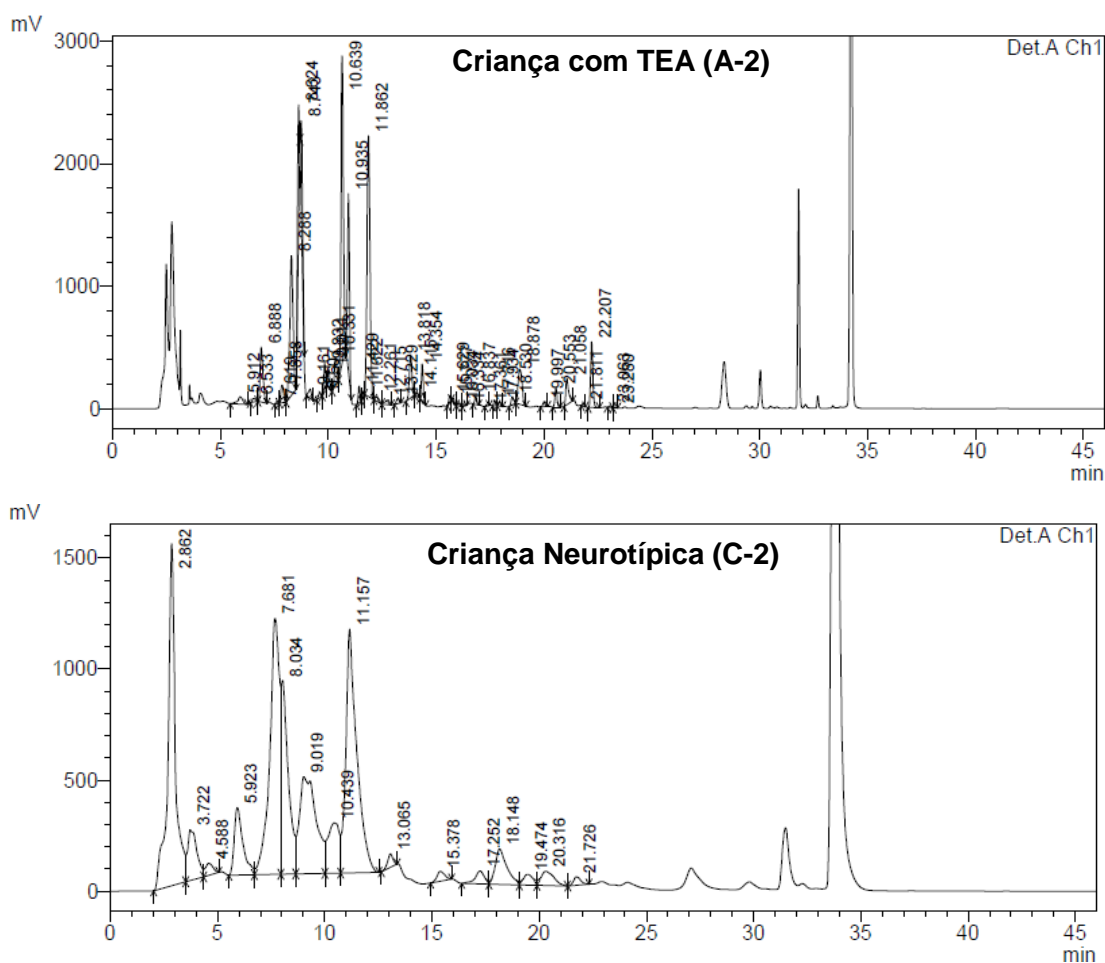


Figura 8 - Cromatograma do perfil de aminoácidos de criança com TEA e de seu respectivo controle. Detecção em 254nm. Fase móvel A (470 mL solução tampão + 30 mL de ACN) e fase móvel B (400ml ACN + 100µl solução de EDTA em pH 8,0).

Tabela 1 - Resultado da separação e determinação da composição de aminoácidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).

Aminoácidos	Estatística Descritiva		Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney	
	Crianças com TEA	Crianças neurotípicas	Valor de U	P valor
	Mediana (IQR) (mg/mL)	Mediana (IQR) (mg/mL)		
Ácido aspártico	0.004 (0.002 - 0.009)	0.025 (0.015 - 0.037)	<b>71.00</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
Ácido glutâmico	0.009 (0.003 - 0.018)	0.010 (0.001 - 0.026)	239.00	0.471
Alanina	0.016 (0.008 - 0.037)	0.047 (0.029 - 0.065)	<b>140.00</b>	<b>0.008</b>
Arginina	0.025 (0.011 - 0.036)	0.000 (0.000 - 0.058)	<b>168.00</b>	<b>0.041</b>
Cisteína	0.004 (0.003 - 0.007)	0.001 (0.000 - 0.026)	186.00	0.094
Fenilalanina	0.010(0.006 - 0.017)	0.013 (0.007 - 0.025)	195.00	0.1350
Glicina	0.038 (0.017 - 0.098)	0.026 (0.019 - 0.035)	<b>167.00</b>	<b>0.039</b>
Histidina	0.004 (0.003 - 0.011)	0.101 (0.027 - 0.134)	<b>72.00</b>	<b>&lt; 0.0001</b>

(continuação)

Aminoácidos	Estatística Descritiva		Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney	
	Crianças com TEA	Crianças neurotípicas	Valor de U	P valor
	Mediana (IQR) (mg/mL)	Mediana (IQR) (mg/mL)		
Isoleucina	0.003 (0.002 - 0.005)	0.013 (0.000 - 0.016)	192.00	0.120
Leucina	0.024 (0.015 - 0.047)	0.018 (0.006 - 0.030)	<b>168.00</b>	<b>0.041</b>
Lisina	0.017 (0.008 - 0.028)	0.013 (0.007 - 0.020)	220.00	0.302
Metionina	0.002 (0.001 - 0.004)	0.000 (0.000 - 0.020)	218.00	0.286
Prolina	1.226 (0.848 - 1.502)	1.192 (0.532 - 1.431)	205.00	0.192
Serina	0.058 (0.037 - 0.078)	0.052 (0.029 - 0.096)	239.00	0.471
Tirosina	0.017 (0.009 - 0.028)	0.042 (0.021 - 0.066)	<b>127.00</b>	<b>0.0035</b>
Treonina	0.025 (0.009 - 0.0659)	0.000 (0.000 - 0.018)	<b>90.00</b>	<b>0.0002</b>

Nota - IQR = intervalo interquartil

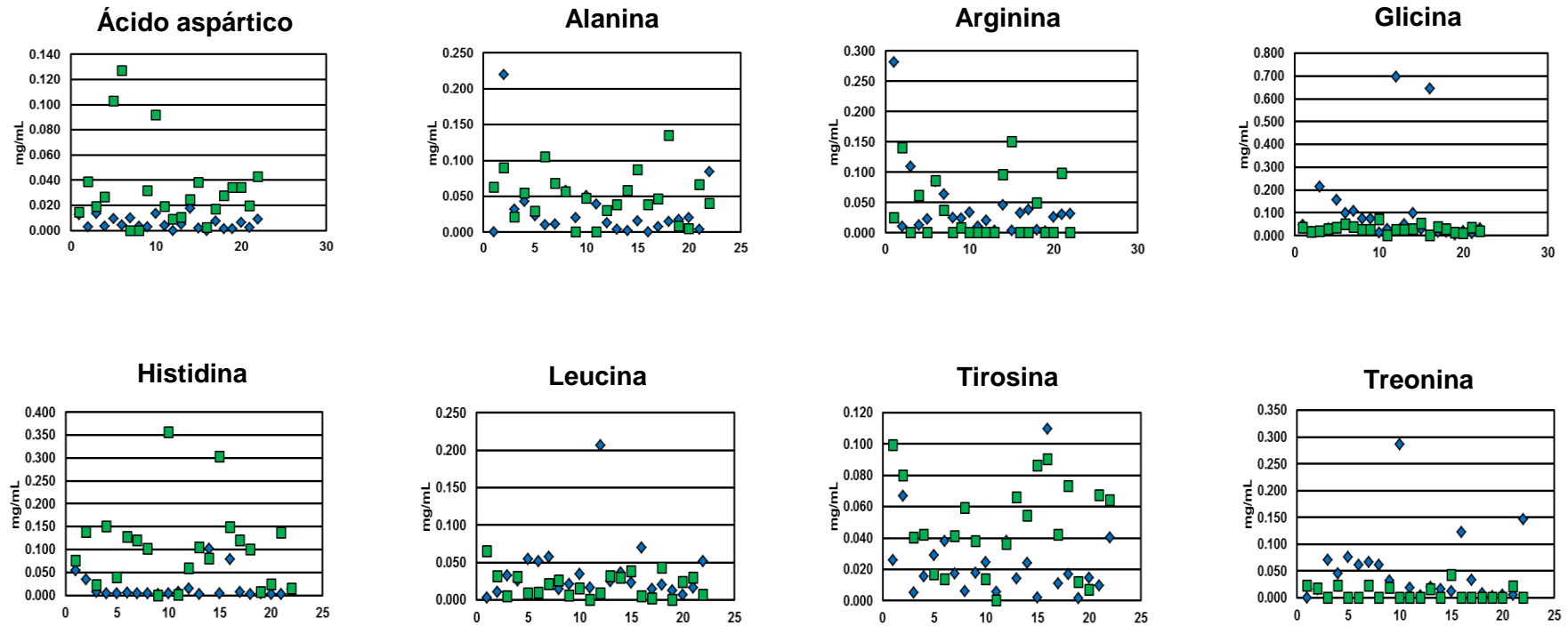


Figura 9 - Gráficos de dispersão dos valores de aminoácidos identificados em amostras de urina que tiveram valores de p significativos.

Nota - ■ Crianças neureotípicas ◆ Crianças com TEA

#### 4.4- Determinação de creatinina método cinético da reação de Jaffé

A mediana da concentração de creatinina urinária encontrada no grupo de crianças com TEA foi de 0.68 mg/mL (IQR, 0.54 - 0.95) e no grupo controle formado por crianças neurotípicas 0.84 mg/mL (IQR, 0.64 - 1.01). A análise das medianas da concentração de creatinina em urina (mg/mL) dos grupos de participantes não demonstrou diferença estatística. A figura 10 ilustra a dispersão dos valores das concentrações de creatinina nas amostras de urina e mediana dos grupos de participantes.

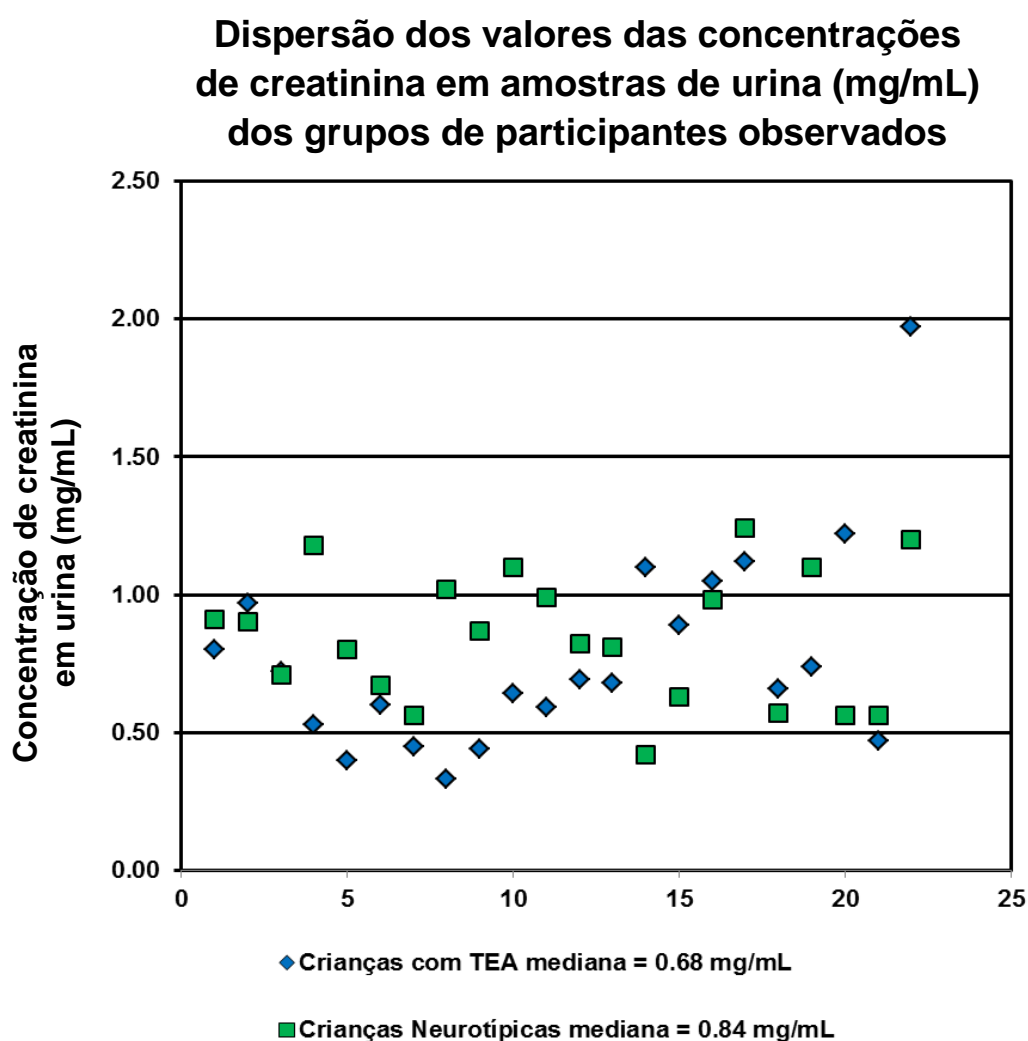


Figura 10 - Gráfico de dispersão das concentrações de creatinina em amostras de urina dos grupos observados com respectivos valores de mediana. Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Valor de  $U = 187.50$  e  $p = 0.1004$ .

#### 4.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Em amostras de urina do grupo controle constituído por crianças neurotípicas foi identificado o maior número de bandas (n=77) quando comparado com amostras do grupo de crianças com TEA (n=54). A figura 11 ilustra o número de bandas identificadas nas amostras de urina dos grupos observados.

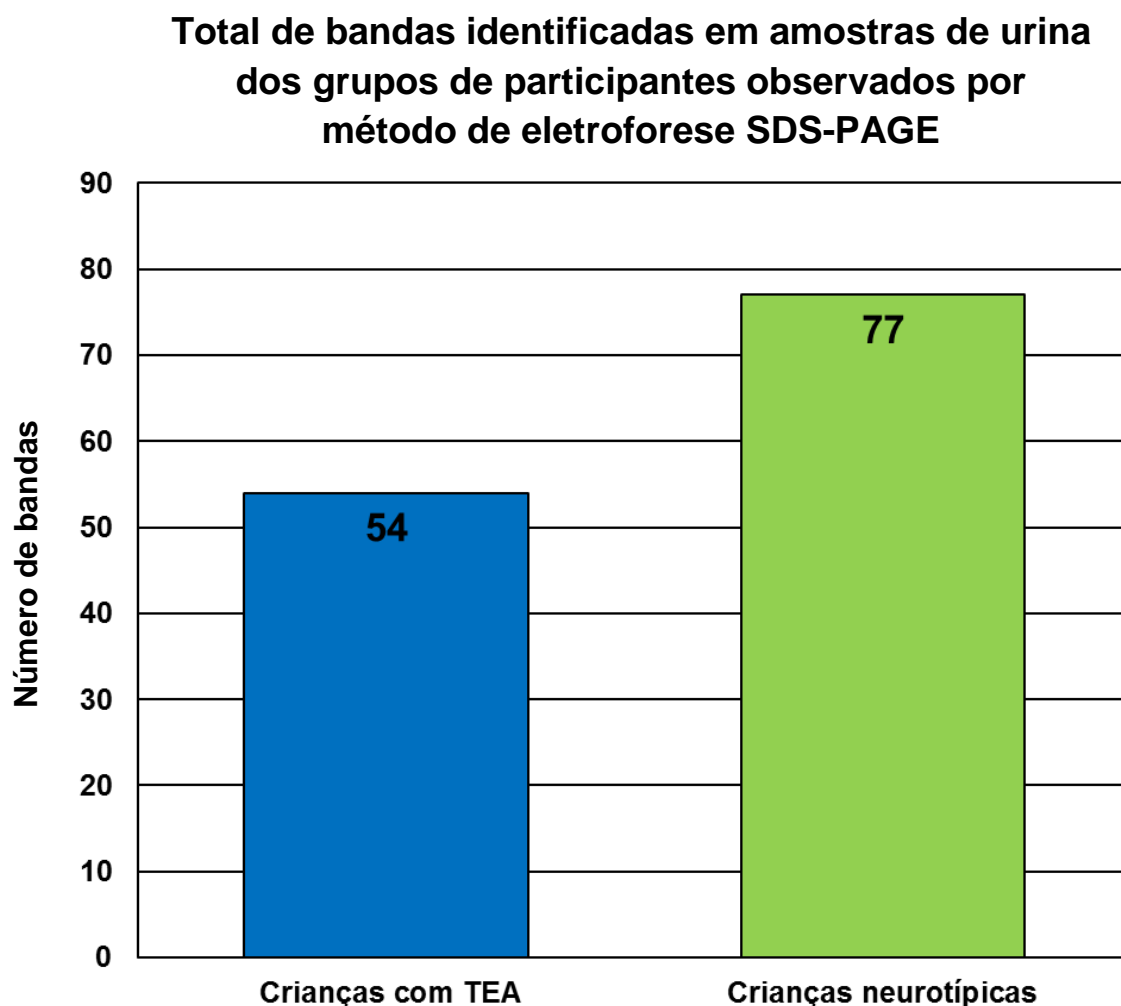


Figura 11 - Gráfico de barras ilustra a quantidade de bandas identificada em amostras de urina dos grupos de participantes observados por método de eletroforese SDS-PAGE.

Em relação ao peso molecular das bandas identificadas no grupo de crianças com TEA (46%) ocorreu uma predominância de bandas com peso molecular na faixa de  $\leq 250$  kDa a  $\geq 150$  kDa e no grupo controle

constituído por crianças neurotípicas ocorreu maior concentração de bandas (31%) com peso molecular na faixa de < 150 kDa a  $\geq 100$  kDa. A figura 12 ilustra a frequência das bandas em amostras de urina de acordo com o peso molecular.

### Frequência de bandas identificadas nas amostras de urina dos grupos de participantes observados de acordo com peso molecular (kDa)

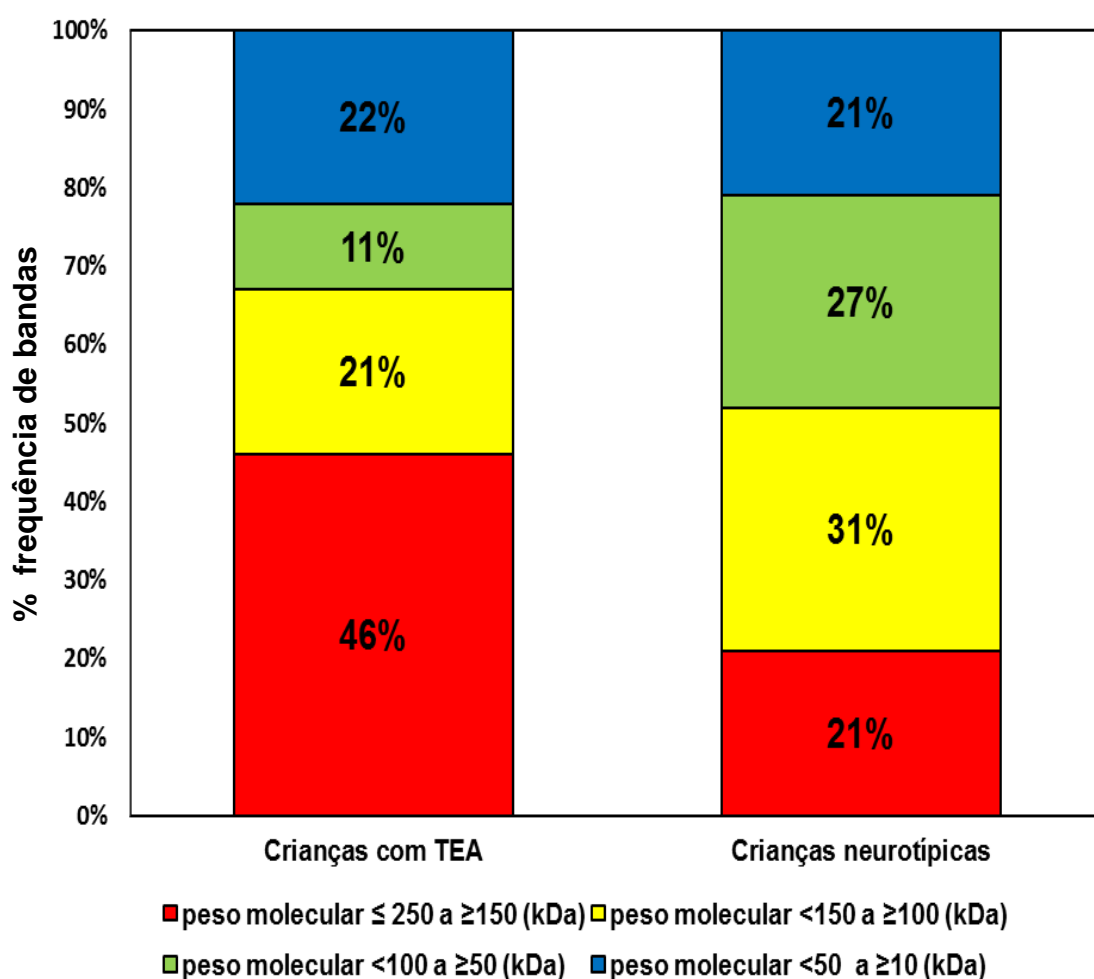


Figura 12 - Gráfico de barras empilhadas ilustra a frequência das bandas identificadas em amostras de urina dos grupos de participantes observados por método de eletroforese SDS- PAGE de acordo com peso molecular.

A maioria das bandas identificada é específica para cada grupo de participantes, mas algumas estavam presentes nos dois grupos. O resultado demonstra trinta e cinco bandas específicas para crianças com TEA,



cinquenta e oito para crianças neurotípicas e dezenove eram comum para os dois grupos. A figura 13 ilustra a distribuição das bandas em seus respectivos grupos onde foram identificadas.

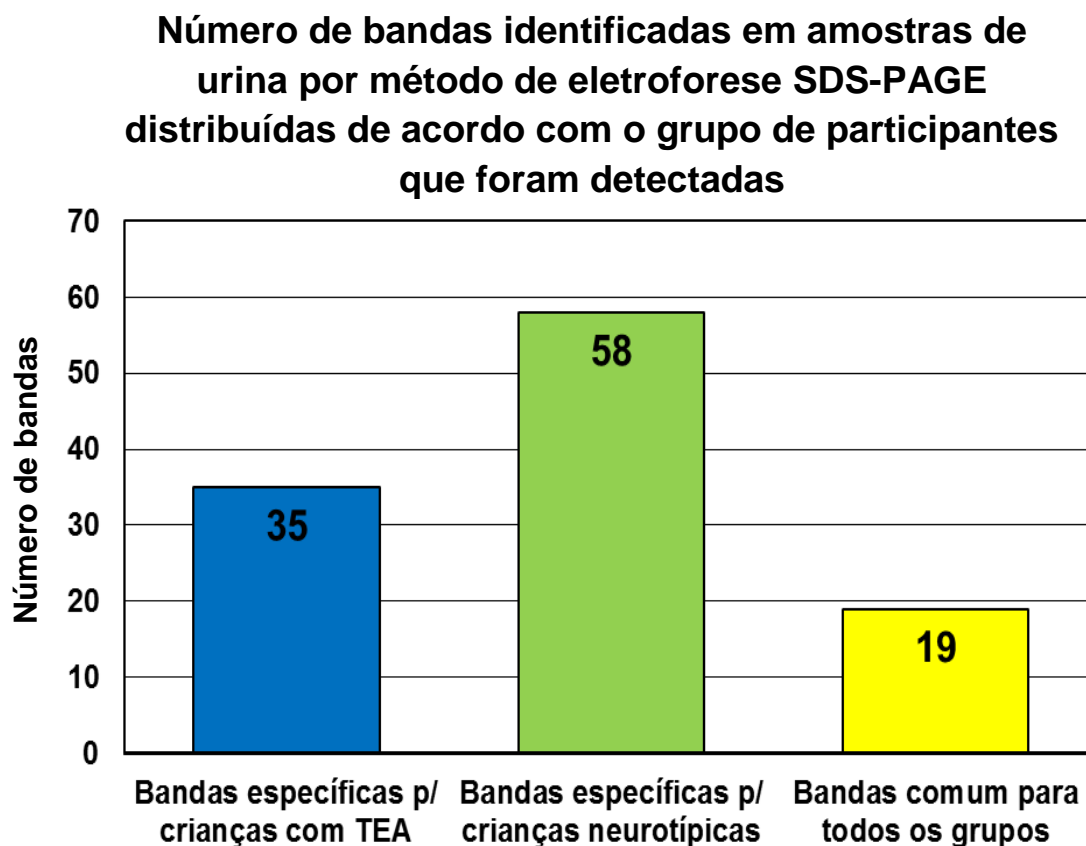


Figura 13 - Gráfico de barras ilustra a distribuição das bandas identificadas em amostras de urina por método de eletroforese SDS-PAGE de acordo com o grupo de participantes que foram detectadas.

Apesar do grande número de bandas detectadas apenas duas apresentaram frequência significativa. Elas estavam presentes nos dois grupos de participantes com frequência distinta. A banda de peso molecular de 10kDa teve maior frequência em amostras de urina de crianças neurotípicas e a banda de 250kDa em amostras de urina do grupo de crianças com TEA. A figura 14 ilustra os géis de SDS- PAGE da urina de crianças com TEA e crianças neurotípicas corados em solução de Coomassie Blue R-25, e a figura 15 descreve a frequência das bandas 10 KDa e 250 kDa nos grupos observados.

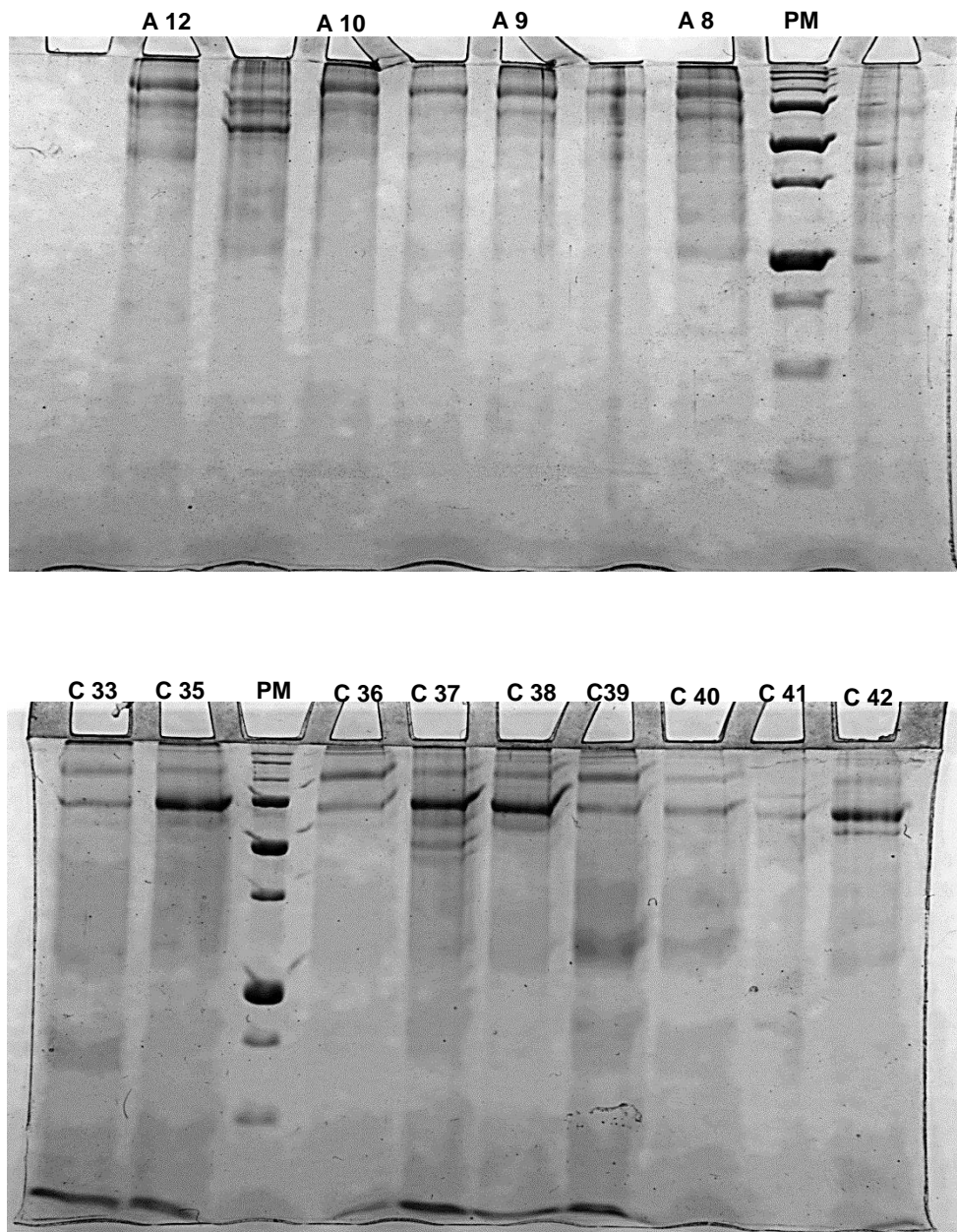


Figura 14 - Gel de SDS-PAGE de urina de grupo formado por crianças com TEA e crianças neurotípicas corado por imersão em solução de Coomassie Blue R-250. Nessa figura podem ser observadas as bandas com peso molecular de 10 kDa e 250 kDa.

Nota - A= Criança com TEA / C= Crianças neurotípica/ PM= Padrão molecular

**Frequência das bandas 10 kDa e 250kDa  
identificadas por método de eletroforese SDS-  
PAGE em amostras de urina dos participantes  
observados**

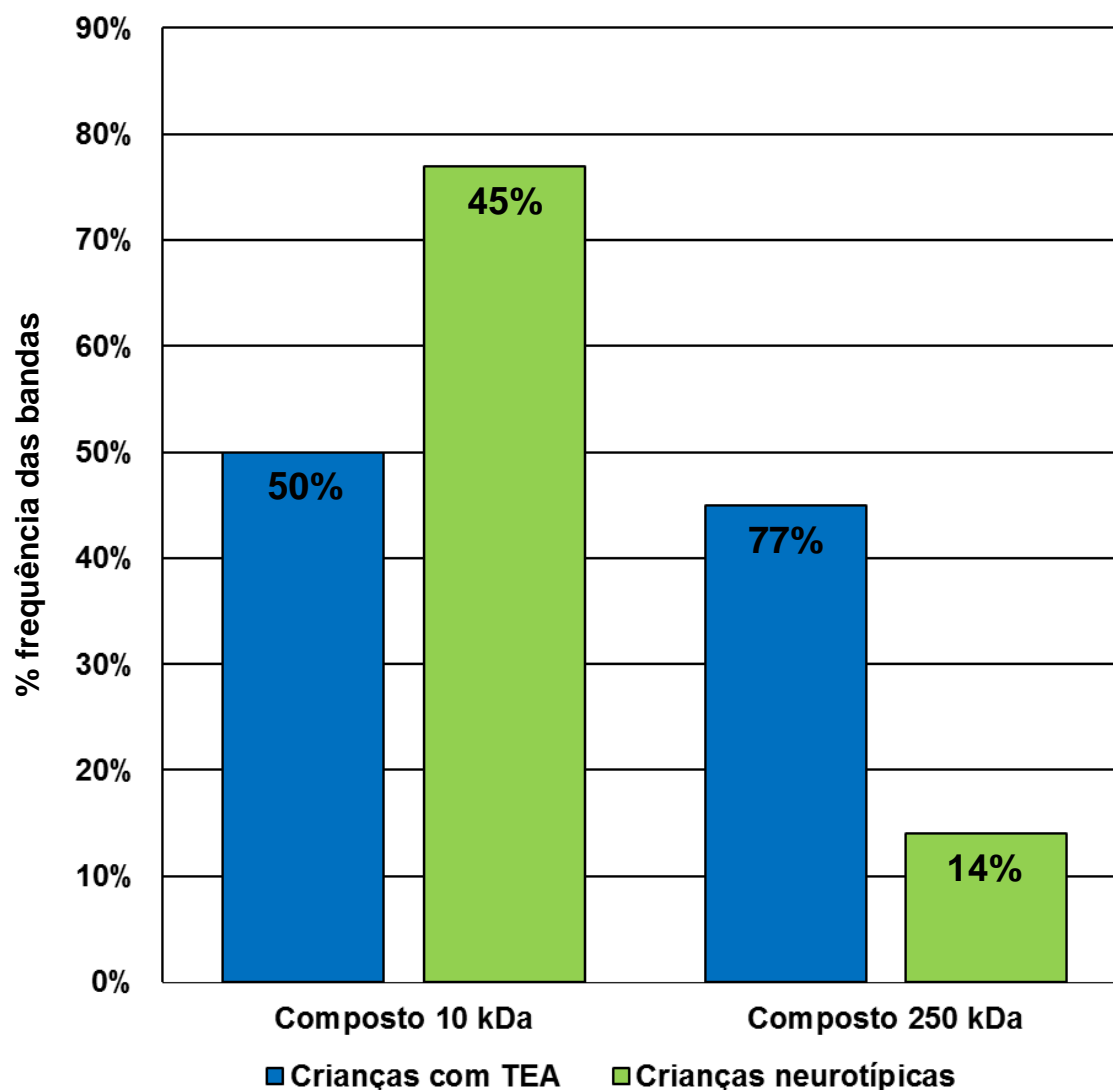


Figura 15 - Gráfico de barras ilustra a frequência das bandas de peso molecular de 10 kDa e 250 kDa identificadas por método de eletroforese SDS- PAGE nas amostras de urina dos grupos de participantes avaliados.

Após identificação das bandas com maior frequência, foi realizada uma busca nas bases de dados PubMed, Web of Science e Scopus com o objetivo de identificar resumos de artigos ou artigos que relatassem uma possível relação entre TEA e proteínas com peso molecular de 10 kDa e 250

kDa. Os termos de pesquisa incluíram: urine, protein, 10 kDa, 250 kDa, autism, autism spectrum disorder e SDA. Nas bases de dados não foram identificadas informações científicas sobre composto proteico com peso molecular de 10 kDa, presente em urina, que tenha relação com TEA. A fibronectina plasmática (FN) foi identificada como possível composto proteico com peso molecular de 250 kDa. A figura 16 ilustra a estrutura da FN plasmática e seus domínios de ligação e a figura 17 demonstra a estrutura química da FN1.

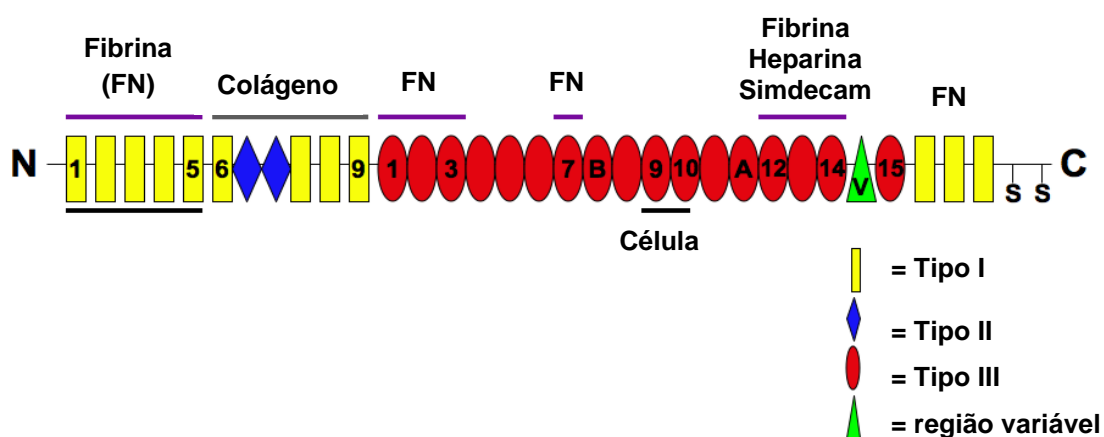


Figura 16 - Estrutura química da fibronectina plasmática e seus domínios de ligação com diferentes compostos.

Fonte - [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The\\_Modular\\_Structure\\_of\\_Fibronectin\\_and\\_its\\_Binding\\_Domains.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:The_Modular_Structure_of_Fibronectin_and_its_Binding_Domains.png)

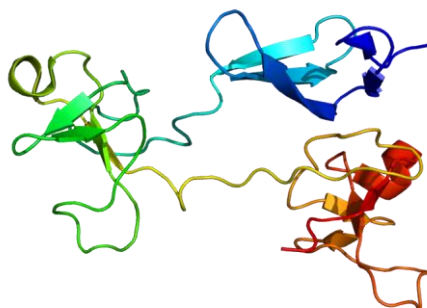


Figura 17- Estrutura química da fibronectina I.

Fonte: Por Emw - Obra do próprio, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8814287>

#### 4.6- Análise por espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser e análise por tempo de vôo (MALDI-TOF)

A análise identificou em amostras de urina do grupo de crianças com TEA (n=23) maior número de espectros do que em amostras do grupo controle (n=9). A figura 18 ilustra o número de espectros identificado nas amostras de urina dos grupos observados.

#### Número de espectros de massas identificados em amostras de urina dos grupos de participantes observados por método de espectrometria de massa MALDI-TOF

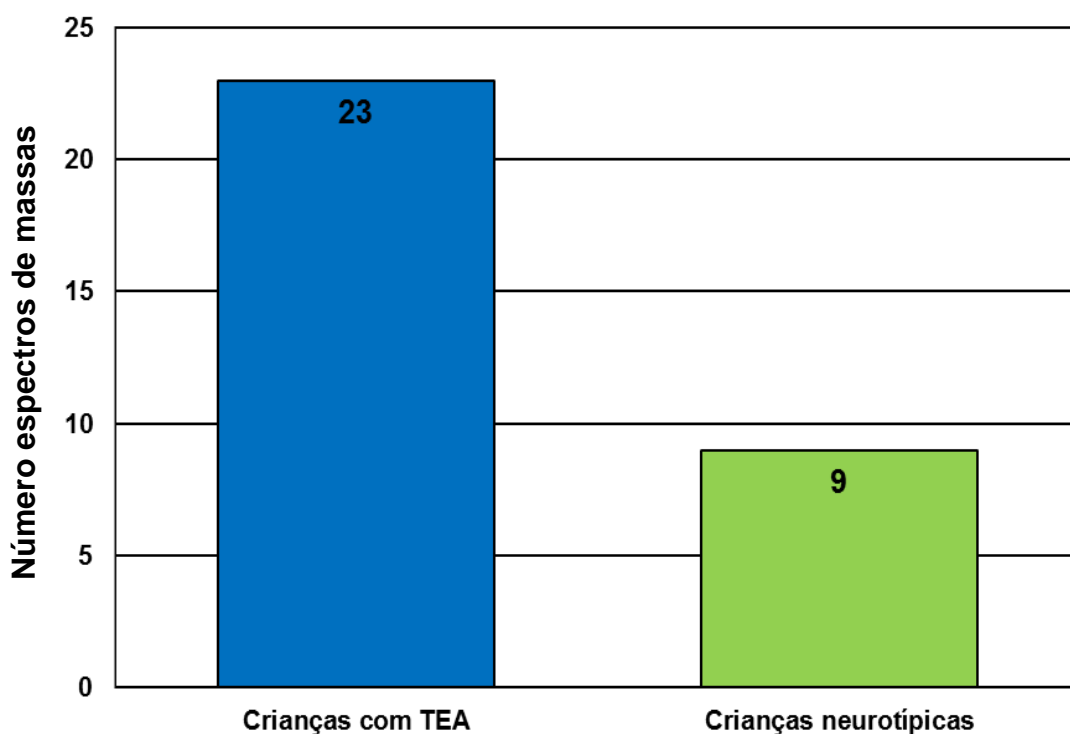


Figura 18 - Gráfico de barras ilustra o número de espectros de massas identificado em amostras de urina dos grupos de participantes observados por método de espectrometria de massa MALDI-TOF.

Da mesma forma que ocorreu na análise por eletroforese SDS-PAGE, a maioria dos espectros identificada é específica para cada grupo de participantes. Um total de dois espectros foi detectado em ambos os grupos. A figura 19 ilustra a distribuição dos espectros em seus respectivos grupos onde foram identificados.

**Número de espectros de massas identificados em amostras de urina por método de análise de espectrometria de massa MALDI-TOF distribuídos de acordo com o grupo de participantes que foram detectados**

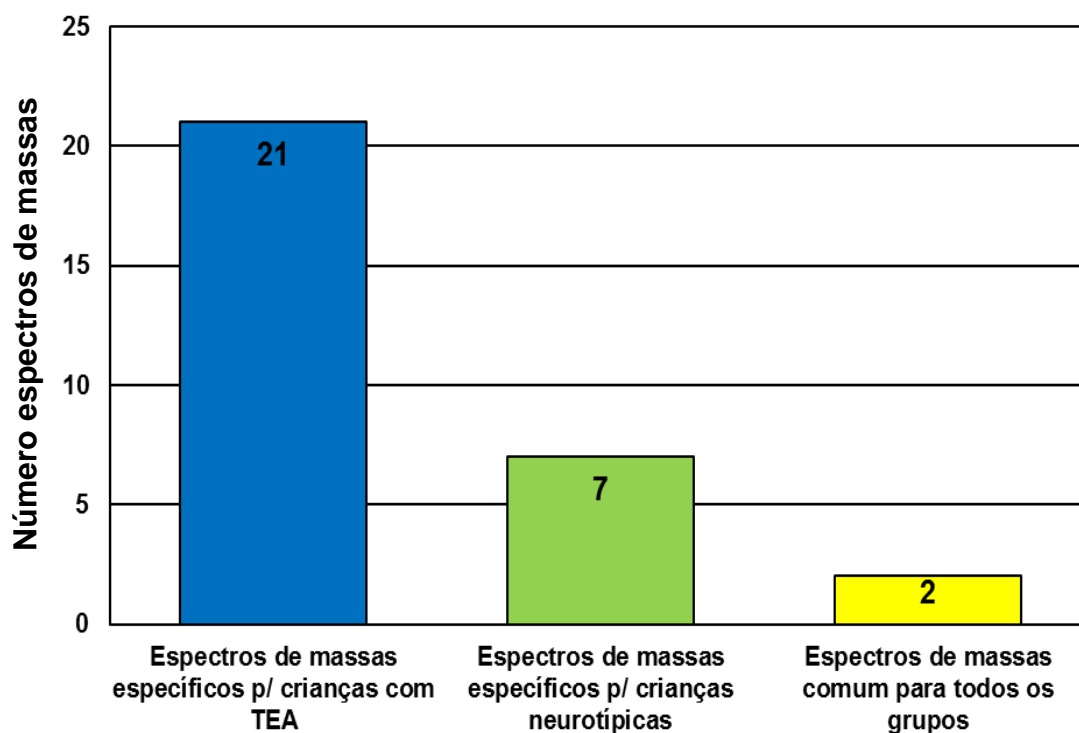


Figura 19 - Gráfico de barras ilustra o número de espectros de massas identificado em urina por método de análise por espectrometria de massa MALDI-TO distribuídos de acordo com o grupo de participantes que foram observados.

Os espectros com massa de 654 Da e 1911Da foram identificados em todos os grupos de participantes com frequência significativa. O espectro de massa 654 Da apresentou maior frequência nas amostras de urina do grupo controle e o espectro de 1911 Da em amostras de crianças com TEA. A figura 20 ilustra a frequência dos espectros de maior relevância identificados nas amostras de urina dos grupos de participantes.

**Frequência dos espectros de massa de maior relevância identificados em amostras de urina dos grupos de participantes por método de análise por espectrometria de massa MALDI-TOF**

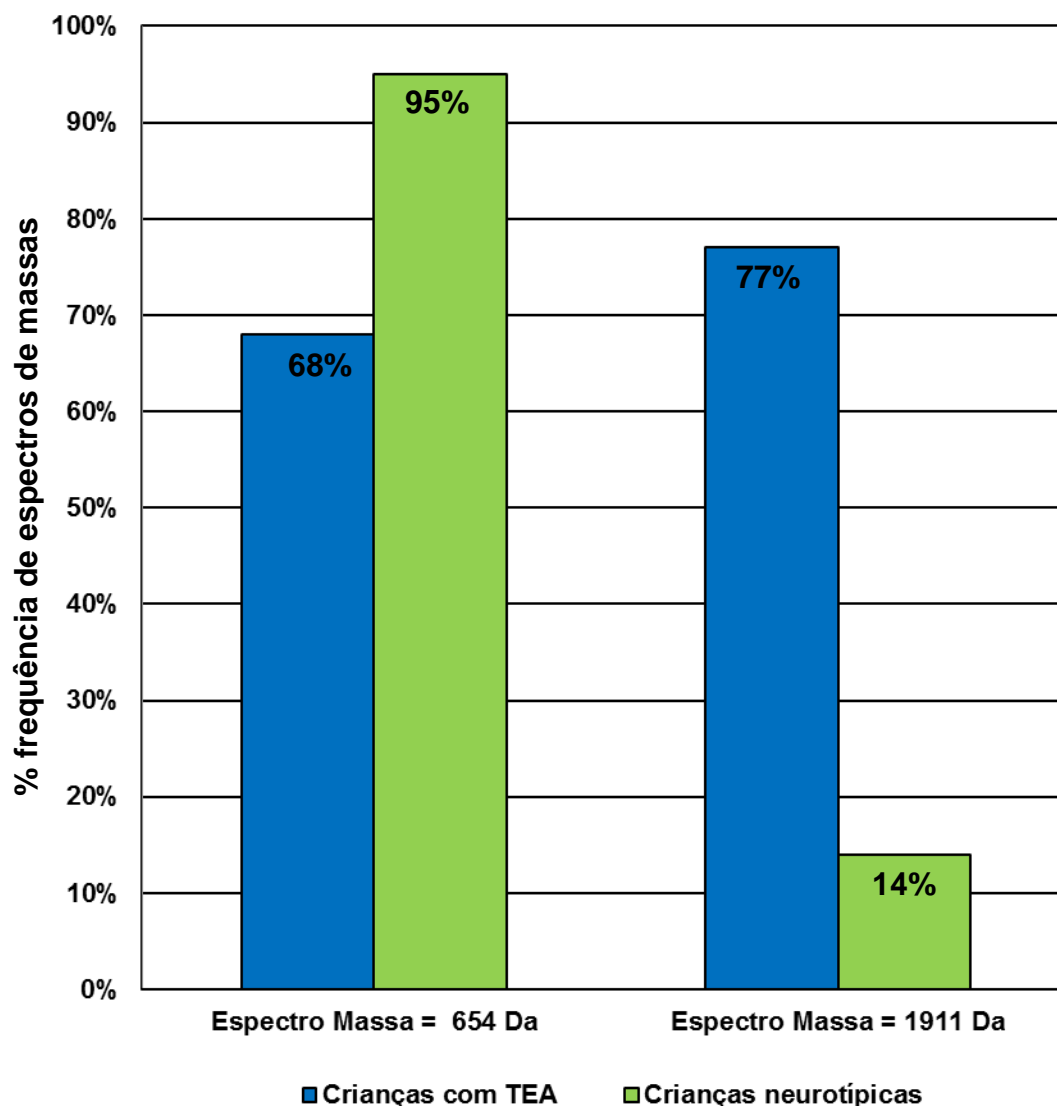


Figura 20 - Gráfico de barras ilustra frequência dos espectros de massas com maior relevância identificados em amostras de urina dos grupos de participantes por método de análise de espectrometria de massa MALDI-TOF.

Após a determinação dos espectros de maior relevância, foi realizada pesquisa nos bancos de dados sobre metabólitos humanos HMDB (The Human Metabolome Database) e METLIN com o objetivo de identificar os possíveis compostos dos espectros de maior relevância. O quadro 5 apresenta de forma resumida o resultado obtido. A figura 21 ilustra a estrutura química dos metabólitos sugeridos pelos bancos de dados.

Quadro 5 - Compostos identificados em bancos de dados a partir do peso molecular dos espectros de maior frequência em amostras de urina dos grupos de participantes observados.

Composto	HMDB ID	Fórmula	Massa (Da)
Coproporfirina II	HMDB0000611	$C^{36}H^{38}N^4O^8$	654
Coproporfirina IV	HMDB0000644	$C^{36}H^{38}N^4O^8$	654
Gangliosideo GT2 (d18:0/14:0)	HMDB0012023	$C_{86}H_{150}N_4O_{42}$	1911

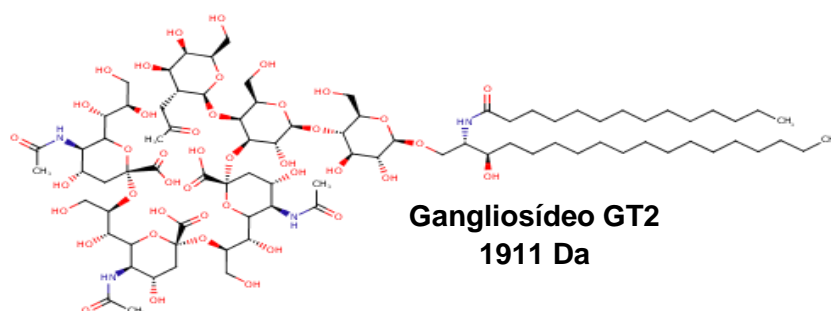
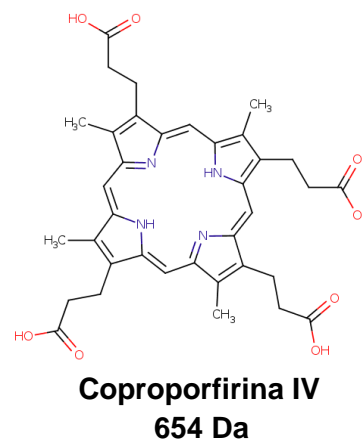
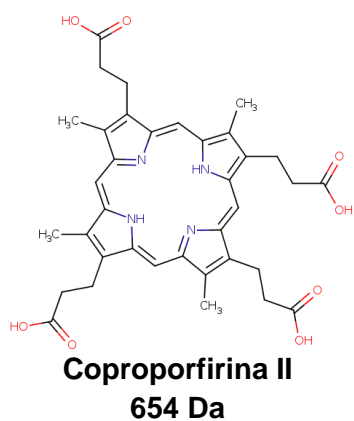
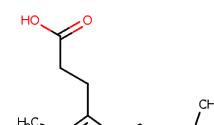


Figura 21 - Estrutura química dos metabólitos sugeridos pelos bancos de dados.

Fonte - <[www.hmdb.ca/](http://www.hmdb.ca/)>. Acesso em: 20/04/2018.

#### 4.7- Análise proteômica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)



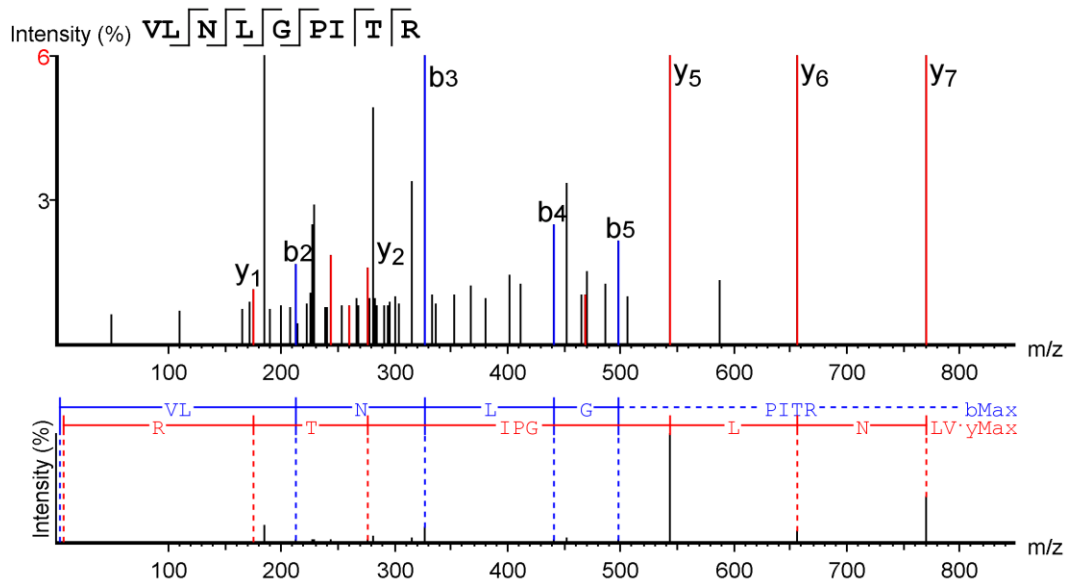


A análise proteômica identificou o espectro de 1911 Da como sendo fragmento da glicoproteína uromodulina. Nesse experimento também foram identificados mais dois fragmentos de uromodulina em amostras de urina de crianças com TEA e um fragmento encontrado em amostras do grupo controle com frequência e peso molecular distintos.

A massa de 654 Da não foi identificada por esse método. O quadro 6 resume o resultado da análise. As figuras 22, 23, 24 e 25 ilustram os espectros de massas representativos, confirmando a identidade dos peptídeos e os quadros de íons fragmentados.

Quadro 6 - Compostos identificados a partir da análise proteômica e suas respectivas frequências em amostras de urina dos grupos de participantes observados.

Composto	Massa Da	Sequência Aminoácidos	Frequência %	
			Crianças com TEA	Crianças neurotípicas
Uromodulina	981.59	VLNLGPITR	0%	4%
Uromodulina	1679.96	VIDQSRVLNLGPITR	18%	0%
Uromodulina	1767.00	SVIDQSRVLNLGPITR	14%	0%
Uromodulina	1911.05	SGSVIDQSRVLNLGPITR	77%	14%



#	b	b-H <sub>2</sub> O	b-NH <sub>3</sub>	b (2+)	Seq	y	y-H <sub>2</sub> O	y-NH <sub>3</sub>	y (2+)	#
1	100.08	82.07	83.05	50.54	V					9
2	213.15	195.15	196.13	107.08	L	883.54	865.53	866.51	442.27	8
3	327.23	309.19	310.18	164.10	N	770.49	752.44	753.42	385.73	7
4	440.34	422.28	423.26	220.64	L	656.48	638.40	639.38	328.70	6
5	497.24	479.30	480.28	249.15	G	543.30	525.31	526.30	272.16	5
6	594.36	576.35	577.33	297.68	P	486.30	468.30	469.28	243.66	4
7	707.45	689.43	690.42	354.22	I	389.25	371.24	372.22	195.13	3
8	808.49	790.48	791.47	404.75	T	276.15	258.16	259.16	138.58	2
9					R	175.12	157.11	158.09	88.06	1

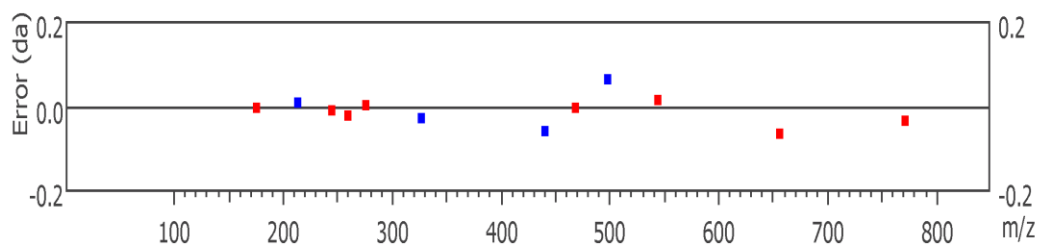
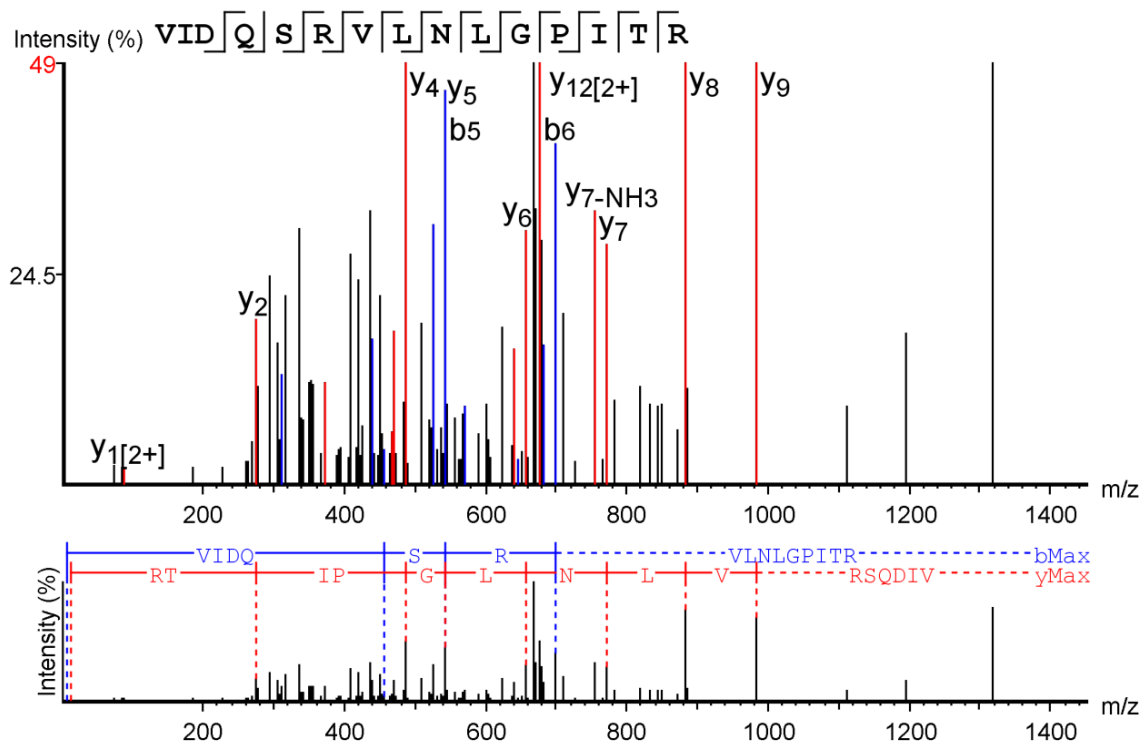


Figura 22 - Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF confirmando a identidade do fragmento de uromodulina VLNLGPIR com peso molecular de 981.597 Da como também o quadro de íons fragmentados.



#	b	b-H <sub>2</sub> O	b-NH <sub>3</sub>	b (2+)	Seq	y	y-H <sub>2</sub> O	y-NH <sub>3</sub>	y (2+)	#
1	100.08	82.07	83.05	50.54	V					15
2	213.16	195.15	196.13	107.08	I	1581.91	1563.90	1564.88	791.45	14
3	328.19	310.18	311.23	164.59	D	1468.82	1450.81	1451.80	734.91	13
4	456.20	438.24	439.25	228.62	Q	1353.80	1335.79	1336.77	677.42	12
5	543.28	525.31	526.27	272.14	S	1225.74	1207.73	1208.71	613.37	11
6	699.43	681.43	682.35	350.19	R	1138.71	1120.69	1121.68	569.85	10
7	798.45	780.44	781.42	399.72	V	982.60	964.59	965.58	491.80	9
8	911.53	893.52	894.50	456.20	L	883.55	865.53	866.51	442.27	8
9	1025.57	1007.56	1008.55	513.29	N	770.43	752.44	753.43	385.73	7
10	1138.66	1120.65	1121.63	569.85	L	656.44	638.40	639.37	328.70	6
11	1195.68	1177.67	1178.65	598.34	G	543.28	525.31	526.27	272.16	5
12	1292.73	1274.72	1275.71	646.92	P	486.33	468.21	469.28	243.65	4
13	1405.82	1387.81	1388.79	703.41	I	389.25	371.24	372.18	195.13	3
14	1506.86	1488.85	1489.84	753.93	T	276.18	258.16	259.14	138.58	2
15					R	175.12	157.11	158.09	87.90	1

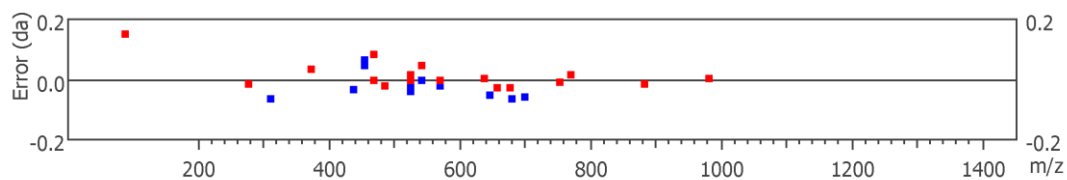


Figura 23 - Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF confirmando a identidade do fragmento de uromodulina VIDQSRV LNLGPI TR com peso molecular de 1679.968 Da como também o quadro de íons fragmentados.

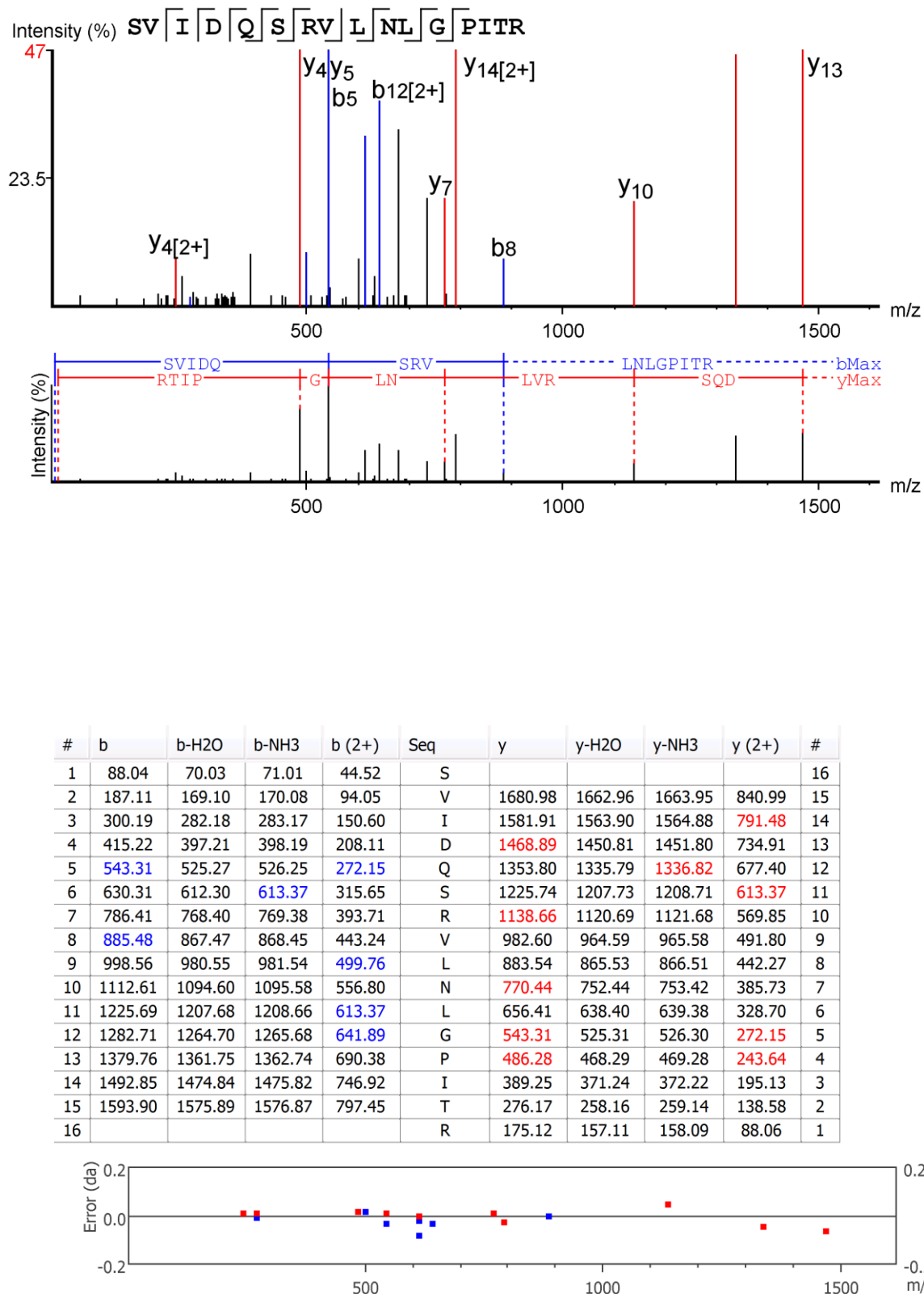


Figura 24 - Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF confirmando a identidade do fragmento de uromodulina SVIDQSRVLNLGPITR com peso molecular de 1767.000 Da como também o quadro de íons fragmentados.



## *Discussão*



## 5- Discussão

Nos primeiros estudos sobre a composição da urina de autistas, foram identificados compostos de origem proteica e padrões cromatográficos específicos de compostos começaram a ser detectados (Gilberg, Trygstad, Foss (1982). Alguns grupos de pesquisa observaram elevada concentração de proteínas em urina de crianças com TEA e correlacionaram com severidade do quadro clínico (Reichelt et al., 1981; Reichelt et al., 2012). A partir dessas constatações vários estudos foram feitos a cerca da composição de compostos de origem proteica. Estes compostos foram inicialmente designados como "oligopeptídeos" (Reichelt et al., 1997).

Em nosso trabalho a concentração de proteína do grupo de crianças com TEA foi estatisticamente inferior ao grupo controle constituído por crianças neurotípicas. O resultado pode estar associado ao fato de que uma grande parte da população de crianças com TEA possui um padrão alimentar restrito. Estudos indicaram correlação direta entre dieta pobre em proteínas de elevado valor biológico e vitaminas do complexo B com baixos níveis de aminoácidos em fluídos corpóreos de crianças com TEA (Arnold et al., 2003; Kałużna-Czaplińska, Michalska, Rynkowski, 2011).

Existem poucos estudos publicados sobre a adequação do consumo de nutrientes de indivíduos com TEA ou pesquisas que compararam a ingestão com grupo controle. Os resultados dos trabalhos são conflitantes e isso dificulta a definição do padrão alimentar ou uma tendência de consumo de alimentos específicos do transtorno. Uma das razões para não ser possível definir um padrão alimentar para indivíduos com TEA está relacionada à elevada prevalência (30% a 90%) de comportamentos inadequados concatenados à alimentação. De acordo com literatura os comportamentos mais frequentes são escolha de uma variedade limitada de alimentos, recusa constante de alimentos e atitudes de indisciplina durante as refeições (crises de choro, agitação, agressividade, autoagressão e

comportamento disruptivo) (Munk & Repp, 1994; Field, Garland, Williams, 2003; Ahearn et al., 2011; Ranjan & Nasser, 2015).

As anormalidades comportamentais relacionadas à alimentação provavelmente estão associadas aos distúrbios centrais do TEA. O déficit de interação social somado a falta de maturidade para a interação social e modelos adequados de comportamentos para as refeições podem dificultar o aprendizado de crianças com TEA em diversas atividades, por exemplo, comer com utensílios apropriados. Muitos indivíduos com TEA não desenvolvem habilidades de comunicação. Esse fato os impede de expressar suas necessidades como fome, saciedade, preferências alimentares e desconforto após as refeições (Lukens & Linscheid, 2008).

O comportamento repetitivo e o interesse restrito podem ter um papel importante na seletividade dietética. As pessoas com TEA por serem resistentes a novas experiências provavelmente transferem esse mesmo padrão para a inclusão de novos alimentos (Herdon et al., 2009; Ranjan & Nasser, 2015).

Outro fato que também limita o consumo de alimentos é a elevada prevalência de sintomas sensoriais em pessoas com TEA (de 69% a 93%) (Baranek et al., 2006; Billstedt et al., 2007; Leekam et al., 2007; Klintwall et al., 2011). Os principais problemas de modulação sensorial expressam como hiper e / ou hipossensibilidade. Tais problemas têm um impacto no desenvolvimento do indivíduo e na capacidade de realizar atividades da vida diária como comer (Mayes & Calhoun, 1999; Talay-Ongan & Wood, 2000; Watling, Deitz, White, 2001; Rogers, Hepburn, Wehner, 2003; Baranek et al., 2006; Leekam et al., 2007).

A refeição é uma experiência sensorial complexa que consiste nos alimentos com sua aparência, odores, texturas e sabores, bem como a presença de outras pessoas, incluindo o componente auditivo de suas conversas. A hipersensibilidade oral é mais frequente em crianças com TEA



do que em crianças com desenvolvimento típico (Watling, Deitz, White, 2001; Rogers, Hepburn, Wehner, 2003; Leekam et al., 2007).

Não se pode descartar a hipótese de que a baixa concentração de proteínas presente em amostras de urina de crianças com TEA pode estar relacionada com a digestão inadequada de proteína dietética causada principalmente por deficiência de enzimas. Essa hipótese não apresenta provas diretas, mas alguns resultados de pesquisas dão sustentação para a mesma.

Horvath et al. (1999) identificaram atividade reduzida de várias enzimas digestivas sacarolíticas em crianças com TEA e que manifestavam sintomas gastrointestinais. No mesmo estudo a caracterização da parte superior do trato digestório revelou diminuição da atividade de uma ou mais dissacaridases ou amilase em 58,3% das crianças com TEA em comparação com controles neurotípicos.

A identificação de peptídeos de origem alimentar (principalmente derivados do leite e trigo), ricos em prolina, em amostras de urina de crianças com TEA conduziu a conclusão de que uma das enzimas deficitária em indivíduos com TEA é a dipeptidil peptidase IV (DPPIV) (Shanahan et al., 2000). Essa enzima pertence à família das serina proteases, é uma aminopeptidase com alta especificidade, crucial para a hidrólise de peptídeos pequenos e que possuem na penúltima posição do N-terminal o aminoácido prolina ou alanina em di-e-tripeptídeos para serem transportados pela parede intestinal (Durinx et al., 2000; Do et al., 2014).

Watanabe et al. (1993) observaram elevada excreção de peptídeos, que continham o aminoácido prolina em sua estrutura, em amostras de urina de ratos com deficiência de DPPIV. Essa enzima se expressa em diferentes células em várias espécies de mamíferos, foi identificada na superfície celular de tecidos envolvidos na mobilização de pequenos peptídeos como os que estão na borda em escova do intestino, nas membranas caniculares de formação da bile no fígado e do córtex renal, na superfície de células T-helper e outras de origem hematopoiética (Durinx et al., 2000).

A DPPIV desempenha um papel fundamental na modificação, processamento e / ou inativação de peptídeos como peptídeos com função de hormônio, várias citocinas, quimiocinas, neuropeptídeos e fatores de crescimento (Mentlein, 1999; Cohen, Fruitier-Arnadin, Piot, 2004).

Apesar de não ser citada em estudos a deficiência de prolil oligopeptidase (POP) pode estar relacionada ao TEA. Essa enzima pertence à mesma família da enzima DPPIV, possui alta especificidade para peptídeos pequenos que contenham na região do C-terminal o aminoácido prolina (García-Horsman, Männistö, Venäläinen, 2007). Em humanos, a atividade de POP medida em fluidos corporais (sangue, fluido seminal, próstata) é muito menor do que em tecidos (Orlowski et al., 1979; Yoshimoto et al., 1979; Taylor et al., 1980; Goossens et al., 1996).

Nos mamíferos, a atividade da POP foi detectada em diversos órgãos e tecidos. Em ratos, alguns estudos indicam que a maior atividade enzimática é encontrada no cérebro, com quantidades decrescentes no fígado, coração, rins, baço, e pulmões (Yoshimoto et al., 1979; Taylor et al., 1980). Existem poucos estudos sobre a distribuição da POP no SNC. Em humanos, a maior atividade da POP foi encontrada no córtex cerebral e menor no cerebelo (Kato et al., 1980; Irazusta et al., 2002). Atividade considerada moderada foi identificada no estriado, no hipotálamo, no hipocampo e na amígdala. Alteração na concentração plasmática de POP está relacionada com doenças psiquiátricas. Pesquisas relatam que indivíduos com depressão maior, depressão melancólica apresentam baixa atividade da POP no plasma, inversamente pacientes maníacos e esquizofrênicos demonstraram maior atividade no plasma (García-Horsman, Männistö, Venäläinen, 2007).

Algumas pesquisas descreveram que a introdução de uma dieta isenta de leite e trigo no tratamento de crianças com TEA contribuiu para a melhora de sintomas comportamentais, bem como redução significativa da excreção de peptídeos em urina (Lucarelli et al., 1995, Reichelt et al., 1997; Knivsberg et al., 2002; Hsu et al., 2009; Whiteley et al., 2010).

A digestão de proteínas também pode ser modificada por deficiência da produção de gastrina que é responsável pela secreção de ácido clorídrico e pepsinogênio como também alterações na produção de colecistoquinina. Horvath et al. (1999) demonstraram que a estimulação do pâncreas de indivíduos com TEA por meio de administração intravenosa de secretina, produz maior excreção de fluido pancreático em comparação com controles saudáveis.

Os autores levantaram a hipótese de que a resposta hipersecretora pode ser devido à ausência de estimulação regular de secretina no pâncreas. No entanto, essa resposta também pode ser devida à insuficiência pancreática crônica, já que o aumento do débito pancreático-biliar foi observado em pacientes com insuficiência pancreática exócrina (Johansson, Schmidt, Hellstrom, 1992). Embora este estudo não tenha encontrado evidências de insuficiência pancreática em crianças com TEA, eles observaram hipertrofia e hiperplasia das células de Paneth. Essas alterações celulares também foram observadas em hamsters após ligadura do ducto pancreático e pacientes com pancreatite crônica (Balas et al., 1980; Senegas-Balas et al., 1982).

A deficiência enzimática pode ter múltiplos mecanismos. O primeiro é a deficiência genética da produção de enzimas que clivam as exorfinas. Inicialmente a deficiência de uma única enzima é suficiente para desencadear o quadro de elevada concentração de peptídeos. Essa condição pode contribuir para a ocorrência de deficiência de outras enzimas, uma vez que peptídeos são bons inibidores de proteases (Seim & Reichelt, 1995; Reichelt & Knivsberg, 2003; Sanctuary et al., 2018). Asano, Nio e Ariyoshi (1991) demonstraram que fragmentos sintéticos de  $\beta$ -casomorfina humana inibe a atividade da prolil oligopeptidase.

Alterações genéticas de funções biológicas que interferem na produção das enzimas também podem contribuir para o quadro de hiperpeptidúria, hiperpeptidemia e baixa concentração de proteína em fluídos corpóreos. Outra disfunção que pode estar associada é o aumento da

produção de peptídeos endógenos observado em indivíduos com TEA (ex. elevada produção de  $\beta$ -endorfina, encefalinas, neuropeptídeos e peptídeos precursores da ocitocina). Essa condição pode limitar a quebra de peptídeos opioides de origem alimentar e endógena, pois como citado anteriormente os peptídeos são excelentes inibidores de proteases (Reichelt & Knivsberg, 2003).

Os quadros de inflamação intestinal também podem contribuir para a redução da produção de enzimas. Smith e Phillips (1990) relataram em seu estudo a redução da capacidade de expressão da enzima DPPIV dos enterócitos de crianças acometidas por doença celíaca.

As reações autoimunes podem produzir anticorpos que inibem as funções de enzimas. Jarmołowska et al. (2007) descreveram menor atividade da enzima DPPIV em crianças que sofrem de sintomas de dermatite atópica comparado com grupo controle formado por crianças saudáveis, sem sintomas de alergia. Finalmente, agentes infecciosos, possivelmente presentes na microbiota intestinal, podem produzir substâncias que inibem a atividade de enzimas (Reichelt & Knivsberg, 2003; Sanctuary et al., 2018). Estudos relataram que antígenos de agentes infecciosos e peptídeos providos da dieta podem se ligar às enzimas de tecidos e formarem autoanticorpos (Vojdani et al, 2002; 2003; 2004).

Alterações na concentração de aminoácidos em fluidos corpóreos também podem ser sintomas de perturbações na digestão de proteínas. Arnold et al. (2003) constataram que crianças com TEA que consomem dieta restrita (isenta de glúten e caseína) e crianças com TEA que consomem dieta irrestrita apresentavam deficiência de aminoácidos essenciais. Adams et al. (2011) encontraram nível reduzido de isoleucina, fenilalanina, triptofano e taurina em plasma de crianças com TEA quando comparado com nível plasmático de crianças neurotípicas; eles hipotetizaram que esse fato está associado à digestão deficiente de proteínas, pois o nível de grande parte dos aminoácidos essenciais em amostras de plasma era equivalente entre crianças com TEA e neurotípicas.

Em nosso trabalho o resultado da análise do perfil de aminoácidos demonstra elevada concentração dos aminoácidos arginina, glicina, leucina e treonina em amostras de urina de crianças com TEA quando comparadas com amostras de urina do grupo controle.

A arginina é um aminoácido proteinogênico semi-essencial amplamente distribuído no cérebro e está envolvido na produção de várias moléculas bioativas como, por exemplo, óxido nítrico e L- citrulina pela enzima óxido nítrico sintase, L- ornitina e ureia pela enzima arginase e agmatina pela enzima arginina descarboxilase. (Rose 1938; Moncada & Higgs, 1993; Wu & Morris, 1998; Morris, 2002).

A arginina e óxido nítrico (NO) atuam no sistema cardiovascular como moléculas antiaterogênicas endógenas que protegem o endotélio, modulam a vasodilatação e interagem com a parede vascular e com as células sanguíneas circulantes (Böger, Bode-Böger, Frölich, 1996; Cooke & Dzau, 1997; Cooke, 2004; Li, Everson, Smart, 2006; Napoli et al., 2006). Juntos, agem no cérebro como neurotransmissores noradrenérgicos não-colinérgicos e também atuam sobre as funções de aprendizagem e memória, plasticidade sináptica e neuroproteção (Bohme et al., 1993; Paakkari & Lindsberg, 1995). Eles também influenciam o sistema imunológico, desempenhando um papel fundamental na regulação dos processos inflamatórios e do estresse redox; modulam o metabolismo da glicose e a atividade da insulina; e regulam a neurogênese. (Potenza, Nacci, Mitolo-Chieppa, 2001; Jobgen et al., 2006).

Acredita-se que a arginina em excesso pode induzir ao estresse oxidativo via produção de NO (Delwing et al., 2008). A elevada concentração de NO foi observada em plasma de crianças com TEA (Zoroğlu et al., 2003). Estudos sobre a concentração de arginina em fluídos corpóreos de indivíduos com TEA apresentam resultados controversos. Kuwabara et al. (2013) identificaram elevada concentração de arginina em amostras de plasma de indivíduos com TEA quando comparadas com grupo controle. Shimura et al. (2011) não identificaram alteração na concentração

plasmática de arginina em crianças com TEA. Anwar et al. (2018) observaram uma redução do clearance renal de arginina em crianças com TEA.

Por outro lado, estudos demonstram uma relação entre transtornos psiquiátricos e doenças neurodegenerativas e concentração de arginina em fluidos corpóreos. Liu et al. (2016) identificaram em estudo *post-mortem* concentração alterada de arginina e seus principais metabólitos L -citrulina, L ornitina e agmatina em amostras de matéria cinzenta do córtex frontal esquerdo de pacientes esquizofrênicos quando comparadas com amostras do grupo controle. Salvatore et al. (2011) em estudo clínico observaram aumento da produção de hormônio de crescimento em 53% de pacientes com diagnóstico de doença de Huntington após tratamento com infusão de arginina.

A natureza precisa da relação entre arginina e estresse oxidativo em distúrbios neuropsiquiátricos não é clara; no entanto, os genes de suscetibilidade comuns para TEA e esquizofrenia, TCF4 e NOS1, foram sugeridos como participantes na via da arginina-NO (O'Donovan et al., 2008; Kim et al., 2009; Talkowski et al., 2012) .

A glicina é um importante neurotransmissor inibitório do SNC de mamíferos. A ação da glicina é mediada por receptores ionotrópicos da família de receptores nicotínicos de acetilcolina que contêm um poro seletivo ao íon cloreto (Spencer, Wenthold, Baker, 1989). Ela atua como transmissor inibitório pós-sináptico predominantemente na medula espinhal e no tronco encefálico e exibe também uma ação excitatória como co-agonista do receptor NMDA ativado por glutamato modulando sua atividade particularmente no córtex e prosencéfalo. Esse aminoácido está envolvido na locomoção, audição e funções cognitivas que podem ser importantes durante o rápido período de crescimento do cérebro (Hunter, Doi, Wenthold, 1992; Thiels, Barrionuevo, Berger, 1994; Aragón & López-Corcuera, 2003; Lynch, 2004).

A glicina é um aminoácido não essencial que pode ser produzida a partir do aminoácido serina, por intermédio da ação da enzima serina - hidroximetil - transferase ou da conversão da colina em sarcosina que, posteriormente, é metabolizada em glicina pela enzima sarcosina-desidrogenase (Danysz & Parsons, 1998).

A degradação da glicina se inicia com a sua conversão para piruvato e posteriormente em serina pela enzima serina – hidroximetil - transferase. Essa enzima usa N5, N10 - metileno - tetra - hidrofolato (N5, N10 - metileno - THF) como um doador de carbono. O grupo metileno dos cofatores N5, N10 - metileno - THF é obtido de uma segunda glicina, que é catalisada pelo sistema de clivagem da glicina. Essa enzima é um complexo multiproteico que se parece com a piruvato - desidrogenase. O sistema de clivagem da glicina é o mediador mais importante da via de degradação da glicina em tecidos de mamíferos. Uma deficiência hereditária nesse sistema causa a doença hiperglicinemia não cetótica, caracterizada por deficiência mental e acúmulo de glicina em fluidos corporais (Voet, Voet, Pratt, 2014).

Durante a vida intrauterina e pós-natal o cérebro humano sofre dois períodos de mudanças. O primeiro período ocorre no início da gravidez e é caracterizado pela proliferação considerável de neuroblastos. O segundo período começa durante o último período de gestação e permanece até o período pós-natal. Esse período é determinado pela expansão do tecido glial, da rede dendrítica e das sinapses (Herschkowitz, 1988). Há evidências de que a transmissão glicinérgica modula a maturação dos dendritos durante o desenvolvimento (Sanes & Choski, 1992).

Um segundo aspecto que deve ser ressaltado é que os receptores de neurotransmissores passam por um desenvolvimento funcional durante a vida fetal e pós-natal, o que torna o cérebro seletivamente imaturo e vulnerável à superestimulação dos receptores de neurotransmissores (Johnston, 1995). Dessa forma, um aumento da concentração de glicina no cérebro pode influenciar o desenvolvimento durante o período perinatal

(Boehm et al., 1998). Outro fator importante que reforça essa hipótese é que a glicina em conjunto com GABA despolarizam os potenciais de membrana e atuam como neurotransmissores excitatórios durante o início do desenvolvimento. Eles passam de neurotransmissores excitatórios para inibidores após nascimento e durante a maturação (Zheng et al., 2017).

Comparado com grupo controle de indivíduos saudáveis, o nível de glicina no plasma e soro de sujeitos com TEA foi relatado como inalterado (Shinohe et al., 2006; Tirouvanziam et al., 2012). O resultado de nossa pesquisa é semelhante aos obtidos por Nadal-Desbarats et al. (2014) e Noto et al. (2014) que identificaram elevada concentração de glicina em amostras de urina de indivíduos com TEA quando comparadas com amostras de grupo controle.

A treonina é um aminoácido essencial para seres humanos, desempenha função de importante resíduo para formação de diversas proteínas, como esmalte dentário, colágeno e elastina. Ele é abundante no plasma humano, principalmente em recém-nascidos (Braverman, Pfeiffer, Blum, 2003; Rydon, 2016).

Esse aminoácido também desempenha função de imunoestimulante, promove o crescimento do timo e desempenha papel importante na defesa imunológica celular do intestino (Braverman, Pfeiffer, Blum, 2003). A treonina é um componente da produção de mucina intestinal e da  $\gamma$ -globulina plasmática em animais (Kim et al., 2007). Através da síntese de proteínas e mecanismos de sinalização celular, a adição de treonina em meios de cultura previne a apoptose, estimula o crescimento celular e promove a produção de anticorpos em linfócitos B (Duval et al., 1991). Estudos de alimentação animal indicam que mudanças nos componentes do sistema imunológico são sensíveis à ingestão dietética de treonina (Li et al., 1999; Dong et al., 2017). A treonina também participa do metabolismo da porfirina e da gordura como também previne o acúmulo de gordura no fígado (Singh, Swaroop, Misra, 1979; Rydon, 2016; Jiang et al., 2017)



A treonina pode ser convertida diretamente em glicina. Essa reação é catalisada pela enzima serina - hidroximetil-transferase, a mesma enzima que adiciona um grupo hidroximetila à glicina para produzir serina. Na reação glicina  $\rightarrow$  serina, a ligação  $C_{\alpha}$ -H do aminoácido é clivada, e a ligação  $C_{\alpha}$  -  $C_{\beta}$  é formada. Diferentemente, a degradação da treonina a glicina pela serina - hidroximetil - transferase atua no sentido inverso, começando com a clivagem da ligação  $C_{\alpha}$  -  $C_{\beta}$  (Voet, Voet, Pratt, 2014).

O excesso de treonina na dieta resulta em níveis aumentados de vários aminoácidos não essenciais, especialmente glicina e serina, devido à estreita relação de seu metabolismo com a treonina (Block & Harper, 1991; Castagné et al., 1993). Teoricamente, elevadas concentrações plasmáticas de treonina podem diminuir a entrada de outros aminoácidos neutros através da competição por meio dos sistemas de transporte na barreira hematoencefálica (Christensen, 1990; Smith, 1988). O catabolismo de treonina em mamíferos parece ser devido principalmente (70-80%) à atividade da treonina desidrogenase (EC 1.1.1.103) que oxida a treonina para 2-amino-3-oxobutirato, que forma glicina e acetil CoA, enquanto a treonina desidratase ( EC 4.2.1.16) que cataboliza a treonina em 2-oxobutirato e amônia, é significativamente menos ativa (Hammer, Rogers, Freeland, 1996) .

A correlação positiva entre as concentrações de treonina e glicina no cérebro indica uma conversão de treonina em glicina. Concentrações elevadas de treonina plasmática devem, portanto, exercer efeitos sobre o sistema neurotransmissor glicinérgico do cérebro. Em estudos não foi identificada correlação entre a concentração de treonina e glicina no fígado, músculo ou plasma, o que pode indicar um metabolismo de treonina diferente e / ou uma utilização diferente de glicina no cérebro em comparação com os outros tecidos periféricos (Boehm et al., 1998).

A deficiência grave de treonina causa disfunção neurológica e claudicação em animais experimentais. Este aminoácido tem sido útil no

tratamento de distúrbios de espasticidade genética e esclerose múltipla (Lee et al., 1990; Hauser et al., 1992).

Pesquisas anteriores obtiveram resultados diferentes do nosso trabalho, Tirouvanziam et al. (2011) e Bala et al. (2016) observaram baixa concentração de treonina em plasma de indivíduos com TEA e Evans et al. (2008) relataram baixa concentração desse aminoácido em urina de pessoas com TEA. A discrepância dos resultados pode estar relacionada ao fato de que nos estudos citados os grupos de participantes eram compostos por indivíduos do sexo feminino e masculino com faixa etária que contemplavam idades em diferentes estágios do desenvolvimento. Nossa pesquisa teve maior controle sobre os grupos de participantes. Foi definida a participação apenas de indivíduos do sexo masculino pelo motivo de que o TEA se expressa de forma diferente entre os sexos como também foram recrutados apenas participantes com até dez anos devido às mudanças neurológicas que ocorrem na puberdade.

A leucina desenvolve dois papéis importantes no SNC: participa na regulação da sinalização dos receptores de rapamicina de mamíferos (mTOR) e alostericamente regula a atividade de algumas enzimas. Ela pode contribuir para a produção de glutamato e glutamina doando grupo amino na reação de transaminação. Em adição exerce função regulatória no metabolismo do glutamato. Em elevada concentração, a leucina alostericamente ativa as duas isoformas de glutamato desidrogenase expressas no cérebro humano. A glutamato desidrogenase 1 (GLDH1) e glutamato desidrogenase 2 (GLDH2), contudo a leucina apresenta maior influência sobre a isoforma GLDH2 (Murín & Hamprecht, 2008, 2009). A GLDH1 é amplamente expressa no cérebro humano, enquanto a GLDH2 está confinada aos astrócitos. A expressão de GLDH2 em astrócitos aumenta potencialmente a oxidação do glutamato e suporta o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) durante processos que demandam energia, como a sinalização glutamatérgica de alta intensidade (Plaitakis, Metaxari, Shashidharan, 2000; Plaitakis et al., 2003, Nissen et al., 2017).

Igualmente a baixa concentração de leucina, atua sinergicamente com ADP na ativação da glutamato desidrogenase. Por consequência, a ativação alostérica pode ser fisiologicamente relevante. Como um sinal abrangente para ampla disponibilidade de material combustível, a leucina, por ativação da glutamato desidrogenase, eleva o nível de 2-oxoglutarato, um membro do ciclo do ácido cítrico. Isso pode acelerar o ciclo, aumentando a capacidade de produção de energia (Murín & Hamprecht, 2008, 2009).

Ao contrário dos demais aminoácidos BCAA, a leucina pode ser nomeada como um importante mensageiro molecular que reflete o estado nutricional do organismo, pois regula o consumo de alimentos. De fato, em elevada concentração, a leucina ativa nos neurônios hipotalâmicos a cascata de sinalização do mTOR que controla o apetite. A proteína mTOR é ativada por atividade do receptor NMDA, receptor tirosina quinase (Trk), receptor metabotrópico de glutamato (mGluR) e receptores dopaminérgicos (D1 e D2) (Hoeffler & Klann, 2010). A proteína mTOR é capaz de fosforilar proteínas em resíduos de serina e treonina. A mTOR regula o nível de tradução e fosforilação de alvos intracelulares, incluindo a proteína ribossomal S6 e proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E (4E-BP1). No SNC, essa proteína quinase é crucial para plasticidade sináptica, aprendizado e formação de memória (Raught, Gingras, Sonenberg, 2001; Carroll, Dyer, Sossin, 2006; Hoeffler & Klann, 2010).

Em pesquisas foram observadas baixa concentração de leucina em plasma, líquido cefalorraquidiano de portadores de TEA quando comparados com grupo controle (Perry et al., 1978; Arnold et al., 2003; Tirouvanziam et al., 2011; Tu et al., 2012). Apesar das limitações metodológicas citadas anteriormente, Evans et al. (2008) também observaram baixa concentração de leucina em amostras de urina de indivíduos com TEA quando comparados com amostras do grupo controle.

A concentração dos aminoácidos ácido aspártico, alanina, histidina e tirosina foi inferior em amostras de urina do grupo de crianças com TEA

quando comparadas com amostra de urina do grupo de crianças neurotípicas.

O ácido aspártico ( $C_4 H_7 NO_4$ ) é um ácido  $\alpha$ -amino, o qual é conhecido por existir em duas isoformas, ácido L-aspártico (L- Asp) e o ácido D-aspártico (D-Asp). Ele é sintetizado no fígado a partir da ação da enzima aspartato aminotransferase que, como o nome indica, transfere um grupo amina do glutamato para o oxaloacetato para formar aspartato (Braverman, Pfeiffer, Blum, 2003). Esse aminoácido possui efeitos excitatórios sobre o SNC, sendo particularmente concentrado no hipocampo e hipotálamo. Ele está presente no cérebro de mamíferos e participa da regulação da plasticidade sináptica (Braverman, Pfeiffer, Blum, 2003; Errico et al., 2008 a,b). A concentração de ácido aspártico é elevada em todo o cérebro durante os períodos embrionário e perinatal e diminui fortemente durante a idade adulta (Curtis, Phillis, Watkins, 1960; Schell, Cooper, Snyder, 1997; Sakai, 1998; Wolosker, D'Aniello, Snyder, 2000; Errico et al., 2008 a,b).

O ácido D-asp está presente em altas concentrações nas vesículas sinápticas dos terminais axônicos; a síntese deste aminoácido ocorre nos neurônios por conversão de L-Asp em D-Asp através da racemase de D-aspartato; a despolarização das terminações nervosas com íons  $K^+$  evoca uma liberação imediata de D-Asp de maneira dependente de  $Ca^{2+}$ ; receptores específicos para D-Asp estão presentes na membrana pós-sináptica. A D-aspartato oxidase, a enzima específica que oxida D-Asp, está presente nas membranas pós-sinápticas; e a estimulação das terminações nervosas com D-Asp desencadeia a transdução de sinal, aumentando o segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP). Tomados em conjunto, estes dados demonstram que D-Asp preenche todos os critérios necessários para ser considerado um neurotransmissor endógeno (D'Aniello et al., 2011).

O resultado de nosso trabalho corrobora com trabalhos anteriores que identificaram em urina e plaquetas de indivíduos com TEA baixa

concentração de ácido aspártico quando comparados com grupo controle (Rolf et al., 1993; Evans et al., 2008)

A alanina não ultrapassa facilmente a barreira hematoencefálica, mas é formada dentro no SNC, particularmente nos astrócitos, por meio da reação de transaminação do piruvato catalisada pela enzima alanina transaminase. O ciclo do glutamato / glutamina que é importante para o funcionamento do cérebro é incompleto sem o retorno de amônia às células gliais. A alanina participa desse ciclo como um transportador importante para a transferência de amônia. A captação de alanina em astrócitos é amplamente mediada pela isoforma LAT2 do sistema L, enquanto a captação de alanina nos neurônios é mediada por transportadores dependentes de Na<sup>+</sup> (Bröer et al., 2007).

A alanina como o glutamato e glutamina, pode ser utilizada como um substrato da gluconeogênese e síntese de glicogênio em cultura de astrócitos e tecidos de cérebro. A infusão de alanina *in vivo* pode causar aumento da concentração de amônia no cérebro, e prejudicar a função cerebral. A infusão de alanina inibe a cadeia respiratória da mitocôndria em cérebros de ratos, mas a infusão de alanina durante período de hipoglicemia auxilia parcialmente o desempenho cognitivo de humanos (Roberts, 2007).

A baixa concentração do aminoácido alanina em amostras de urina de crianças com TEA quando comparadas com amostras de crianças neurotípicas identificada em nosso trabalho também foi observada no trabalho de Evans et al. (2008) e Ming et al. (2012).

O aminoácido histidina é precursor da histamina. A conversão de histidina em histamina ocorre pela ação da enzima histidina descarboxilase (HDC). A histamina é liberada por mastócitos, basófilos e neurônios (Bekkers, 1993; Parsons & Ganellin, 2006; Haas, Sergeeva, Selbach, 2008; Saras et al., 2008; Bianchi, Clark, Fisher, 2011; Kletke et al., 2013).

A histamina desempenha funções distintas: secreção ácida gástrica, imunomodulação, contração da musculatura lisa (brônquica), vasodilatação

(vascular), bem como controle da barreira epitelial e endotelial. Essas ações têm importantes implicações para as funções gastrointestinal, imunológica, cardiovascular, reprodutiva e neurológica (Haas, Sergeeva, Selbach, 2008).

Os neurônios histaminérgicos se originam do núcleo tuberomamilar do hipotálamo posterior e enviam projeções para a maior parte do cérebro. O sistema central de histamina está envolvido em muitas funções cerebrais, tais como excitação, controle da secreção de hormônios hipofisários, supressão de coma e funções cognitivas (Parsons & Ganellin, 2006). Os efeitos da histamina neuronal são mediados pelos 4 subtipos de receptores (H1, H2, H3 e H4) acoplados à proteína G (Tashiro & Yanai, 2007).

Vários dos papéis fisiológicos da histamina estão relacionados à sua capacidade de aumentar a excitabilidade dos neurônios do SNC. De fato, no cérebro, a histamina tem sido sugerida como um regulador da atividade do "cérebro inteiro" (Wada et al., 1991). Todas as evidências disponíveis de várias espécies mostram que os neurônios histaminérgicos, quando ativados, aumentam a vigília e induzem a excitação eletrográfica. O receptor H 1 no hipotálamo ventrolateral é um sítio importante para esse efeito (Lin et al., 1990). O início do sono tem sido atribuído a células que estão presentes na área pré-óptica ventral do hipotálamo, que, quando ativadas, supostamente desligam as células histaminérgicas no núcleo tuberomamilar. Assim, a histamina é um importante regulador dos ciclos de sono - vigília e provavelmente contribui também para outras funções cerebrais (Hough, 1999).

A histamina é um poderoso regulador de muitas funções hipotalâmicas. As respostas neuroendócrinas, especialmente a liberação de vasopressina, são fisiologicamente reguladas pelos neurônios histaminérgicos (Kjaer et al., 1994; Hatton & Yang, 1996). A histamina hipotalâmica também pode participar da regulação fisiológica da ocitocina, prolactina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e liberação de  $\beta$ -endorfina. A regulação dos dois últimos ocorre por alterações na liberação do hormônio

liberador de corticotrofina e da vasopressina (Knigge & Warberg, 1991; Knigge et al., 1998).

A histamina neuronal também é um modulador eficaz da ingestão de alimentos e água (Onodera et al., 1994; Sakata & Yoshimatsu, 1995). A histamina e compostos que aumentam as concentrações de histamina extracelular são poderosos inibidores da ingestão de alimentos. Uma ação sobre o receptor H 1 no hipotálamo ventromedial parece ser responsável por esses efeitos (Ookuma et al., 1993). Múltiplos mecanismos hormonais e neuronais também podem contribuir para esse efeito (Kraly et al., 1996). Outros papéis sugeridos para a histamina na regulação das funções vegetativas incluem termorregulação, regulação do metabolismo de glicose e lipídios e controle da pressão arterial (Phillipu, 1993; Sakata et al., 1994).

Estudos revelaram que alterações no sistema histaminérgico estão presentes em doenças neurológicas e psiquiátricas (Langlais et al., 1994; Onodera et al., 1994). Os níveis de histamina cerebral estão reduzidos em pacientes com doença de Alzheimer, inversamente concentrações elevadas são encontradas nos cérebro de indivíduos com Parkinson e pacientes esquizofrênicos. A capacidade da histamina de aumentar a transmissão excitatória nos receptores NMDA pode explicar suas ações neurotóxicas (Langlais et al., 1994). No entanto, a histamina neuronal nem sempre aumenta o dano cerebral; parece exercer um efeito protetor em alguns modelos de isquemia cerebral (Tashiro & Yanai, 2007; Nuutinen & Panula, 2010). A histamina neuronal também está envolvida na percepção da dor. As drogas que aumentam a concentração de histamina no cérebro e medula espinhal têm propriedades antinociceptivas (Gogas & Hough, 1989; Hough, 1998).

Vários outros sistemas transmissores podem interagir com os neurônios histaminérgicos. O receptor H 3 funciona como um heteroreceptor inibitório. Assim, a ativação dos receptores H 3 do cérebro diminui a liberação de acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina e certos peptídeos. No entanto, a histamina também pode aumentar a atividade de

alguns desses sistemas através dos receptores H<sub>1</sub> e / ou H<sub>2</sub>. A ativação de receptores NMDA,  $\mu$  opioide, dopamina D<sub>2</sub> e alguns receptores de serotonina podem aumentar a liberação de histamina neuronal, enquanto outros receptores parecem diminuir a liberação (Hough, 1999; Tashiro & Yanai, 2007).

A baixa concentração de histamina em amostras de urina de crianças com TEA identificada em nosso trabalho também foi relatada no trabalho de Evans et al. (2008), Ming et al. (2012) e Nadal-Desbarats et al. (2014).

A tirosina é substrato para a produção das catecolaminas (dopamina, norepinefrina, epinefrina) (Gibson, 1986; During, Acworth, Wurtman, 1988; McTavish, Cowen, Sharp, 1999; Fernstrom, 2005). Estudos indicam que a baixa concentração de tirosina conduz a menor disponibilidade de neurotransmissores e decréscimos no desempenho cognitivo e de comportamento (Muly, Szigeti, Goldman-Rakic, 1998; Goldman-Rakic, Muly, Willians, 2000; Fernstrom, 2005). A concentração desse aminoácido no cérebro é influenciada diretamente pela proteína ingerida não apenas em uma única refeição, mas também é afetada pelo perfil do conteúdo proteico da dieta durante vários dias (Fernstrom & Faller, 1978; Peters & Harper, 1985; Fernstrom, Volk, Fernstrom, 1986; Gustafson et al., 1986; Fernstrom & Fernstrom, 1987; 1995).

Os níveis plasmáticos de tirosina atingem o pico entre uma e duas horas após o consumo e podem permanecer significativamente elevados até oito horas (Glaeser et al., 1979). Uma vez passada a barreira hematoencefálica é absorvida pelas células cerebrais apropriadas, em seguida a tirosina é convertida em L-DOPA por meio de enzima chamada tirosina-hidroxilase (TH) (Daubner et al., 2011).

A atividade da TH aumenta inicialmente com o consumo de tirosina, mas é regulada pela inibição do produto final, impedindo grandes aumentos na liberação de catecolaminas (Nagatsu & Levitt, 1964; Spector et al., 1967;



Kaufman & Kaufman, 1985; Tam et al., 1990; Daubner, Le, Wang, 2011). A L-DOPA é convertida em dopamina, resultando em um aumento no nível de dopamina. Por sua vez, a dopamina pode ser convertida em norepinefrina através da enzima dopamina beta-hidroxilase (Kaufman & Friedman, 1965). É importante ressaltar que estudos demonstraram que a ação da tirosina em aumentar a síntese de neurotransmissores ocorre apenas em neurônios de disparo ativo (Lehnert et al., 1984; Tam et al., 1990; Fernstrom & Fernstrom, 2007). Isso sugere que a tirosina pode reverter um processo chamado de depleção de neurotransmissores, no qual o aumento da atividade cerebral leva a níveis reduzidos de dopamina e norepinefrina, acarretando o declínio dos níveis de desempenho comportamental.

O resultado de nosso trabalho se soma aos resultados observados em literatura. Tirouvanziam et al. (2011), Tu, Chen, He (2012) e Naushad et al. (2013) identificaram baixa concentração de tirosina em plasma de indivíduos com TEA. Evans et al. (2008) também observaram baixa concentração de tirosina em urina de crianças com TEA.

Podemos levantar a hipótese de que disfunções do metabolismo de aminoácidos podem atuar de diversas formas na fisiopatologia do TEA como também contribuir para intensificação de sintomas centrais do transtorno e comorbidades. Os aminoácidos identificados com concentrações alteradas em amostras de urina de crianças com TEA participam de várias etapas da neurogênese e maturação do SNC como os aminoácidos ácido aspártico, leucina, alanina. Estudos *post - mortem* e de neuroimagem demonstraram desregulação da neurogênese, migração e maturação neuronal em indivíduos com TEA (Lyll, Schmidt, Hertz-Picciotto, 2014).

Alguns sintomas presentes em indivíduos com TEA estão associados à desregulação da produção de monoaminas neurotransmissoras (dopamina, norepinefrina e serotonina). A produção desses neurotransmissores depende da disponibilidade de aminoácidos, principalmente do triptofano. As monoaminas estão relacionadas com a regulação de certos comportamentos e estados emocionais, funções

motoras, cognitivas, atenção, aprendizagem e resposta aos estressores, funções evidentemente alteradas em pacientes com TEA (Schwartzman, 2011).

O ciclo glutamato/glutamina se resume no armazenamento do glutamato na forma de glutamina em astrócitos até que seja transferido para terminais pré-sinápticos e convertido de volta a glutamato. Alguns aminoácidos que se encontram com concentração alterada nas amostras de urina de crianças com TEA participam dessa via metabólica. A disfunção da mesma pode afetar a plasticidade neuronal e a cognição.

Alterações do trato digestório e do sistema imunológico apresentam elevada frequência em indivíduos com TEA (Onore, Careaga, Ashwood, 2013; Hsiao, 2014). Um dos fatores que podem contribuir são as alterações metabólicas dos aminoácidos arginina, treonina, histidina que estão intimamente ligados ao funcionamento desses sistemas.

A figura 26 ilustra o resumo das atividades fisiológicas desempenhadas pelos aminoácidos com concentrações alteradas em amostras de urina de crianças com TEA identificados em nosso trabalho.

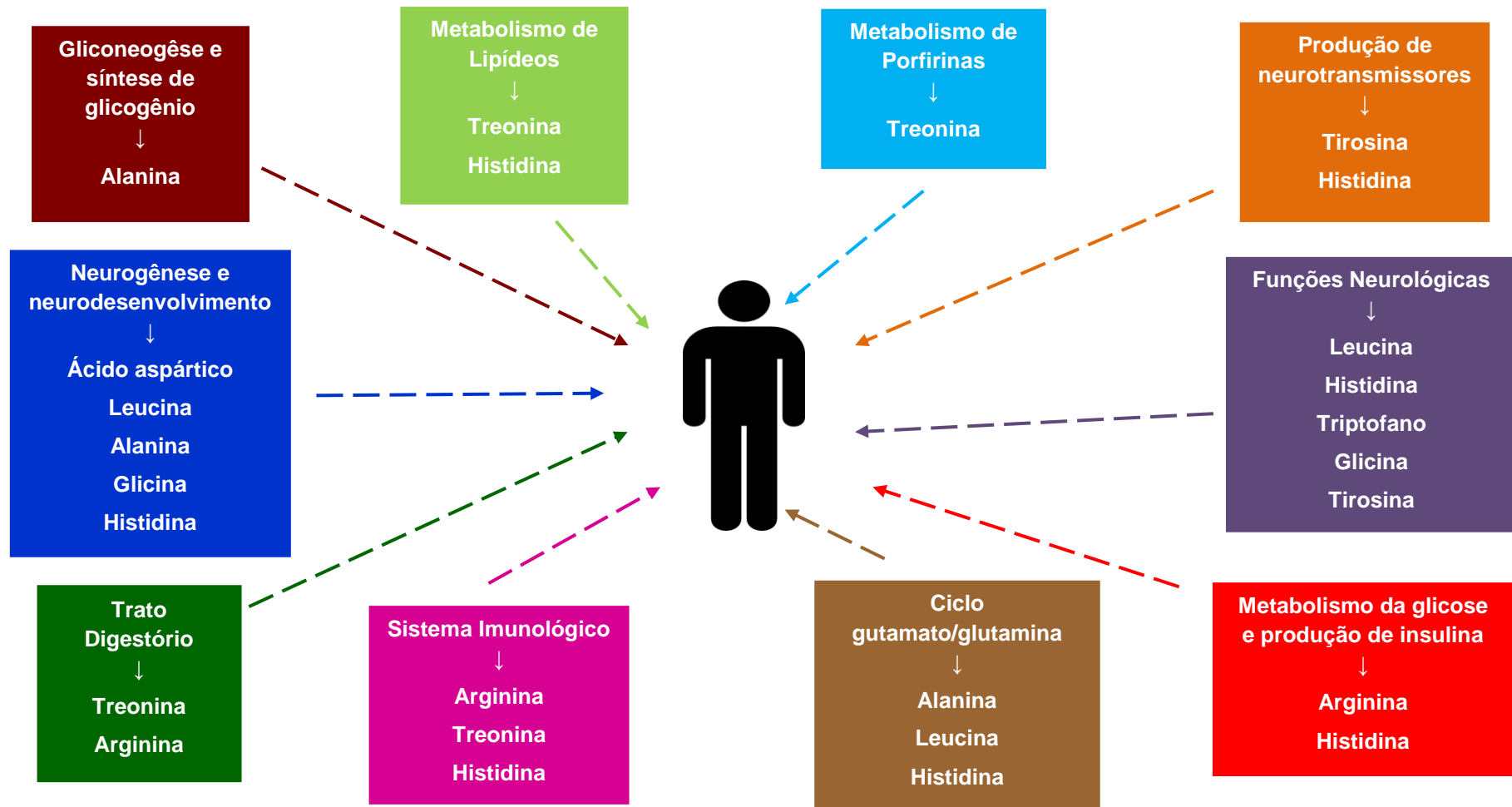


Figura 26 - Resumo das atividades fisiológicas desempenhadas pelos aminoácidos com concentrações alteradas em amostras de urina de crianças com TEA.

Inicialmente em pesquisas sobre a composição da urina de autistas a creatinina era utilizada apenas como um meio de corrigir a concentração de compostos em urina, mas com a identificação de erros metabólicos associados à creatina em autistas ocorreu a necessidade de investigar a concentração da creatinina nos fluidos corpóreos.

Nos grupos avaliados não foi observada diferença significativa entre as medianas da concentração de creatinina em amostras de urina. A concentração de creatinina em urina pode não ser um bom candidato a biomarcador para o TEA. Nataf et al. (2008) não identificaram diferenças significativas nos níveis de creatinina na urina de crianças com TEA (n = 217) e controles (n = 23), mesmo depois da normalização das variáveis idade e sexo. Outro fato a ser observado é que a prevalência real dos erros metabólicos relacionados à creatina em indivíduos com TEA não é conhecida. Schulze et al. (2016) relataram uma baixa prevalência de CDS em crianças com TEA. Nesse trabalho os autores não observaram correlação entre mutações dos genes patogênicos de CDS e TEA.

Na literatura o excesso de solutos urinários foi descrito em 10-60% de indivíduos com TEA, dependendo da etnia (Reichelt et al., 1997; Yap et al., 2010). Solutos urinários representam um conjunto quimicamente heterogêneo de pequenas moléculas, aparentemente capaz de produzir diagnóstico útil a partir de padrões metabólicos (Emond et al., 2013).

Em pessoas com TEA foram identificados compostos originários de bactérias intestinais e subsequente metabólitos hepáticos, tais como p-cresol e p-cresil sulfato respectivamente, como também, compostos relacionados aos processos inflamatórios e alterações do TGI (Yap et al., 2010; Altieri et al., 2011; Yang et al., 2016). Sacco et al. (2010) relataram que coletivamente, o excesso de solutos urinários pode representar um endofenótipo associado ao autismo e familiares.

A análise de eletroforese SDS-PAGE identificou uma tendência inversa, as amostras de urina de crianças com TEA apresentaram maior

frequência de compostos de elevado peso molecular do que o grupo de crianças neurotípicas.

Na pesquisa de literatura não foi identificada proteína ou composto com peso molecular de 10 kDa associado ao TEA. De acordo com estudos que analisaram a composição proteica de amostras de urina por método de cromatografia líquida de fase reversa (RP- HPLC), esse fluido corpóreo é composto por uma grande concentração de albumina com peso molecular de 10 kDa. Pesquisas que utilizaram técnicas de espectrometria de massa em tandem acoplada à cromatografia líquida (LC-MS/MS) e espectrometria de massa MALDI-TOF concluíram que a composição proteica da urina de indivíduos sem alterações metabólicas é constituída por diversos peptídeos, fragmentos e proteínas inteiras que são originárias do plasma e dos rins que estão entre a faixa de peso molecular 1 kDa a 10 kDa (Thongboonkerd et al., 2007).

A glicoproteína FN que foi identificada em literatura como possível composto de peso molecular de 250 kDa , com maior frequência na urina de crianças com TEA, forma um dímero e cada subunidade possui uma porção amino-terminal e uma porção carboxi-terminal. Pontes dissulfeto ligam uma subunidade à outra, próximo à porção carboxi-terminal de cada uma delas. A FN possui sítios de interação com várias moléculas (Manabe et al., 1997; Nardin, 2006).

As isoformas da FN são codificadas por um único gene, que possui 50 éxons aproximadamente, e codifica três tipos de subunidades homólogas repetitivas chamadas de tipo I, II e III (Nardin, 2006). Os módulos são classificados de acordo com o tipo e numerados em ordem crescente da porção amino-terminal para a porção carboxi-terminal. Os monômeros são compostos por doze repetições do tipo I, duas do tipo II e quinze a dezessete do tipo III (Gravina, 2010). O RNA mensageiro que codifica a FN tem duas formas de junção, dando origem à FN celular e à FN plasmática.

A forma celular da FN é uma proteína insolúvel existente na matriz extracelular com aproximadamente 550 kDa. A FN plasmática é uma proteína solúvel de 250 kDa. Ela se liga à fibrina, auxiliando na estabilização do coágulo, que preenche as lacunas criadas por lesões e atua como substrato para deposição de matriz extracelular e formação de matriz provisória durante a recuperação das lesões. As propriedades estruturais e funcionais são semelhantes entre as duas formas, que têm função de adesão, diferenciação celular e migração (Armstrong & Armstrong, 2000; Kierszenbaum & Tres, 2012).

As proteínas da FN plasmática também estão envolvidas na via clássica da resposta imunológica. A isoforma da fibronectina 1 (FN1) participa da migração celular, sinalizando adesão às células, apoptose e no sistema complemento. A FN1 liga um grande número de moléculas, incluindo, complemento, proteoglicanos, células e bactérias. Uma das funções da FN1 é a adesão de células a materiais extracelulares. Especificamente, a FN1 liga-se a C1q, estando envolvida na depuração de material revestido com C1q, como complexos imunes, agentes infecciosos e detritos celulares (Bing et al., 1982).

Corbett et al. (2007) identificaram elevada concentração de FN1 em amostras de soro de crianças com TEA quando comparadas com amostras de crianças neurotípicas. A elevada excreção de FN em urina foi relatada em algumas patologias renais e na síndrome de Bardet-Biedl que é definida como uma desordem genética, de caráter autossômico recessivo, caracterizada por distrofia retiniana, polidactilia, obesidade, atraso mental e hipogenitalismo (Caterino et al., 2018).

Na análise de espectrometria de massa por método MALDI-TOF foi observada maior frequência de diferentes espectros de massa nas amostras de urina de crianças com TEA do que nas amostras do grupo de crianças neurotípicas.

O espectro de peso molecular 654 Da foi identificado no banco de dados como coproporfirinas II e IV. Esses compostos são isômeros que constituem apenas 1% a 2% de todas as coproporfirinas. As coproporfirinas são produtos finais da oxidação espontânea das pontes de metileno do coproporfirinogênio, decorrente da síntese do heme e são secretados nas fezes como também na urina (Jacob et al., 1989; HMDB, 2018). Os metais pesados podem inibir as enzimas uroporfirina descarboxilase e coproporfirinogênio oxidase (Woods & Kardish, 1983; Woods et al., 2005). A elevação subsequente de coproporfirina e pentacarboxiporfirina pode ser detectada na urina como marcador de níveis elevados de metais pesados. Concentrações elevadas de porfirinas são encontradas na urina de animais de laboratório, como também de humanos expostos a metais pesados (Bowers et al., 1992). Estudos indicam maior concentração de porfirinas remanescentes, especificamente hexacarboxil, pentacarboxil e coproporfirinas em urina de indivíduos com TEA do que em indivíduos neurotípicos (Woods et al., 2010).

A frequência elevada de porfirinas em amostras de urina, principalmente em crianças neurotípicas, poderia ser explicada por exposição a metais pesados, mas é apenas uma especulação para análises futuras, pois não foram levantados os índices de exposição anterior ao mercúrio, como também análise de identificação e quantificação de metais pesados em fluídos corpóreos dos participantes (Woods, Bowers, Davis, 1991; Woods et al., 1993).

O espectro de 1911 Da, mais frequente nas amostras de urina de crianças com TEA foi identificado nos bancos de dados como gangliosídeo GT2 (d18:0/14:0). Os gangliosídeos são glicoesfingolipídeos (ceramida + oligossacarídeo) compostos por um ou mais ácidos siálicos ligados às cadeias de açúcar. Até o momento, 188 gangliosídeos com diferentes estruturas de carboidratos foram identificados em vertebrados. Eles são encontrados em tecidos e fluidos corporais e são mais abundantemente expressos no SNC e podem chegar a 6% do peso total de seus lipídeos. Nas

células, eles são principalmente, localizados nos folhetos externos das membranas plasmáticas (Yu et al., 2011; Kolter, 2012; HMDB, 2018).

Até presente data estudos que tinham como objetivo estabelecer uma relação entre produção de gangliosídeos e autismo, não analisaram urina, apenas líquido cefalorraquidiano e soro.

No trabalho Lekman et al. (1995) foi avaliada a concentração dos quatro principais gangliosídeos cerebrais, GM1, GD1a, GD1b e GT1b, em amostras de líquido cefalorraquidiano de crianças com TEA e comparadas com amostras de grupo controle formado por crianças neurotípicas e crianças com diferentes formas de distúrbios neurológicos não progressivos, sem características clínicas de TEA. Os gangliosídeos GM1, GD1a, GD1b e GT1b foram significativamente aumentados em pacientes com TEA em comparação aos grupos controles. Mostafa e Ly (2011) identificaram elevados níveis séricos de anticorpos anti-gangliosídeos M1 em crianças com TEA.

A análise proteômica não identificou o espectro de 654 Da, mas detectou o espectro de 1911 Da. Apesar da identificação de um mesmo espectro, a análise divergiu da natureza do mesmo. Segundo essa análise o espectro corresponde ao fragmento da glicoproteína uromodulina. Diferentes fragmentos desse composto foram identificados com maior frequência nas amostras de crianças com TEA.

A uromodulina, também conhecida como proteína de Tamm-Horsfall, é uma glicoproteína de 105 kDa expressa exclusivamente nos rins por células epiteliais que revestem o ramo ascendente espesso (TAL - thick ascending limb) da alça de Henle. É uma proteína ancorada em glicosilfosfatidilinositol localizada principalmente na membrana plasmática apical de células epiteliais TAL. A uromodulina é secretada no túbulo renal através de uma clivagem proteolítica conservada (Santambrogio et al., 2008). Na urina, constitui a proteína mais abundante sob condições



fisiológicas normais e é principalmente encontrada como polímeros de alto peso molecular (Serafini-Cessi et al., 2003).

A função biológica da uromodulina é complexa e apenas parcialmente compreendida. Estudos experimentais com camundongos demonstraram que esse composto protege contra infecções do trato urinário e formação de cálculos renais (Bates et al., 2004; Liu et al., 2010). Pesquisas também relataram a função da uromodulina em modular a atividade das células da imunidade inata via sinalização do receptor Toll-like 4 (Säemann et al., 2005) ou via de ativação do inflamassoma ( Darisipudi et al., 2012) e regular a granulopoese e a homeostase sistêmica dos neutrófilos (Micanovic et al., 2015). Finalmente, está envolvido na regulação do transporte de NaCl nas células epiteliais TAL, baseado no seu papel na promoção da expressão superficial do canal renal de potássio (ROMK2) e do cotransportador de sódio-potássio-cloreto (NKCC2) (Mutig et al., 2011; Renigunta et al., 2011). Alterações na excreção desse composto ou de seus fragmentos estão relacionadas às condições fisiológicas como doenças renais, doenças cardiovasculares, transplantes de rins.

Rosen, Yoshida, Croen (2007) em um estudo de caso-controle identificaram maior frequência de diagnóstico de infecções geniturinárias nos primeiros dois anos de vida em crianças com TEA quando comparadas com crianças neurotípicas. Ramsey et al. (2013) relataram elevada concentração de uromodulina em amostras de plasma de crianças com TEA quando comparados com amostras de plasma de irmãos neurotípicos.

Apesar do resultado da análise de proteômica divergir da análise de espectrometria de massa em relação à natureza dos compostos identificados, não pode ser excluída a possibilidade da existência de todos os possíveis compostos identificados nas amostras de urina. Para confirmar a presença desses compostos é necessário o desenvolvimento de metodologia de identificação específica para cada metabólito.

Em nosso trabalho não foram identificados em amostras de urina dos grupos de voluntários observados peptídeos de origem alimentar, derivados do glúten ou caseína, bem como compostos associados às alterações da microbiota intestinal. De acordo com literatura a frequência de peptídeos opioides de origem alimentar em urina de autistas é baixa. A  $\beta$  casomorfina 1-7 é detectada em apenas 5% a 10% dos portadores de TEA (Reichelt et al., 2012). A razão para não termos identificado compostos derivados de alterações na composição da microbiota intestinal pode estar relacionada ao fato de que os métodos empregados não sejam adequados, pois diferem dos observados em literatura. A maioria das pesquisas utilizou metodologia específica para esses compostos e também empregaram diferentes técnicas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FLD) (Anderson et al., 2002; Altieri et al., 2011; Gabriele et al., 2014; Xiong et al., 2016).

## *Conclusões*



## 6- Conclusões

1. A concentração de proteína em urina se mostrou um bom marcador biológico para o TEA.
2. Os aminoácidos urinários são fortes candidatos à biomarcadores de diversas doenças incluindo o TEA.
3. A concentração de creatinina em urina não constitui um marcador adequado para o TEA.
4. A análise de eletroforese SDS-PAGE permitiu a identificação de composto de 250 kDa com elevada frequência em crianças com TEA.
5. O espectro de peso molecular 654 Da e 1911 Da foram identificados em banco de dados como coproporfirinas (II e IV) e gangliosídeo GT2 (d18:0/14:0) respectivamente.
6. A análise proteômica identificou fragmentos com diferentes pesos moleculares da glicoproteína uromodulina.
7. Apesar do resultado da análise de proteômica divergir da análise de espectrometria de massa em relação à natureza dos compostos identificados, não pode ser excluída a possibilidade da existência dos mesmos em urina de crianças com TEA.
8. Não obstante, um grande número de estudos sobre os metabólitos urinários no TEA ser publicado, atualmente não há fortes evidências de que um único metabólito pode ser significativo para a detecção do TEA ou ser conclusivo para a identificação da etiologia ou fisiopatologia do TEA. Vários metabólitos urinários são potencialmente úteis, mas exigem estudos com maior número de amostras e bem controlados para validação.

# *Bibliografía*



## Bibliografia

- Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet.* 2008; 9: 341-355.
- Adams JB, Audhya T, McDonough-Means S, Rubin RA, Quig D, Geis E, et al. Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity. *Nutr Metab.* 2011; 8(1): 34.
- Ahearn W, Castine T, Nault K, Green G. An assessment of food acceptance in children with autism and pervasive developmental disorder-not otherwise specified. *J Autism Dev Disord.* 2001; 31(5): 505-511.
- Altieri L, Neri C, Sacco R, Curatolo P, Benvenuto A, Muratori F, et al. Urinary p-cresol is elevated in small children with severe autism spectrum disorder. *Biomarkers.* 2011; 16(3): 252-260.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* Arlington, VA: 2013.
- Anderson RJ, Bendell DJ, Garnett I, Groundwater PW, Lough WJ, Mills MJ, et al. Identification of indolyl-3-acryloylglycine in the urine of people with autism. *JPP.* 2002; 54(2): 295-298.
- Andres RH, Ducray AD, Huber AW, Perez-Bouza A, Krebs SH, Schlattner U, et al. Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. *J. Neurochem.* 2005a; 95(1): 33-45.
- Andres RH, Huber AW, Schlattner U, Perez-Bouza A, Krebs SH, Seiler RW, et al. Effects of creatine treatment on the survival of dopaminergic neurons in cultured fetal ventral mesencephalic tissue. *Neuroscience.* 2005b; 133(3): 701-713.
- Anthony A, Sim R, Murch SM, Walker-Smith JA, Wakefield AJ. Lymphonodular hyperplasia of the ileum with increased MHC class II antigen expression and macrophage infiltration of the colon in children with regressive developmental disorder. *Gut.* 1998; 42(1): A24(Abstract).
- Anwar A, Abruzzo PM, Pasha S, Rajpoot K, Bolotta A, Ghezzi A, et al. Advanced glycation endproducts, dityrosine and arginine transporter dysfunction in autism - a source of biomarkers for clinical diagnosis. *Mol Autism.* 2018; 9: 3.
- Aragón C, López-Corcuera B. Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *Eur J Pharmacol.* 2003; 479(1-3): 249-262.

Araújo A C, Lotufo Neto F. Nova classificação americana para os transtornos mentais - o DSM-5. *Rev. Bras. de Ter. Comp. Cogn.* 2014; 16(1): 67-82.

Armstrong PB, Armstrong MT. Intracellular invasions and the organizational stability of tissues a role for fibronectin. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1470(2): 09-20.

Arnold GL, Hyman SL, Mooney RA, Kirby RS. Plasma amino acids profiles in children with autism: potential risk of nutritional deficiencies. *J Autism Dev Disord.* 2003; 33(4): 449-454.

Artigas-Pallarés J, Paula-Pérez I. Deconstruyendo a Kanner. *Rev Neurol.* 2017; 64(1): 9-15.

Artigas-Pallarés J, Paula-Pérez I. El autismo 70 años después de Leo Kanner y Hans Asperger. *Rev Asoc Esp Neuropsiq.* 2012; 32(115): 56-587.

Asano M, Nio N, Ariyoshi Y. Inhibition of prolyl endopeptidase by synthetic peptide fragments of human beta-casein. *Agric Biol Chem.* 1991; 55(3): 825-828.

Ashwood P, Anthony A, Torrente F, Wakefield AJ. Spontaneous mucosal lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms: mucosal immune activation and reduced counter regulatory interleukin-10. *J Clin Immunol.* 2004; 24(6): 664-673.

Ashwood P, Corbett BA, Kantor A, Schulman H, Van de Water J, Amaral DG. In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism. *PLoS One.* 2011a; 6(5): e19299.

Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de Water J. Altered T cell responses in children with autism. *Brain Behav Immun.* 2011b; 25(5): 840-849.

Asperger H. Die 'Autistischen Psychopathen' im Kindesalter. *Arch Psychiatr Nervenkr.* 1944; 117: 76-136.

Baird G, Simonoff E, Pickles A, Chandler S, Loucas T, Meldrum D, et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the special needs and autism project (SNAP). *Lancet.* 2006; 368(9531): 210-215.

Bala KA, Doğan M, Mutluer T, Kaba S, Aslan O, Balahoroğlu R, et al. Plasma amino acid profile in autism spectrum disorder (ASD). *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016; 20(5): 923-929.

Balas D, Senegas-Balas F, Bertrand C, Frexinós J, Ribet A. Effects of pancreatic duct ligation on the hamster intestinal mucosa. Histological findings. *Digestion*. 1980; 20(3): 157-167.

Balzola F, Barbon V, Repici A, Rizzetto M, Clauser D, Gandione M, et al. Panenteric IBD-like disease in a patient with regressive autism shown for the first time by wireless capsule enteroscopy: another piece in the jig-saw of the gut-brain syndrome? *Am J Gastroenterol*. 2005; 100(4): 979-981.

Baranek GT, David FJ, Poe MD, Stone WL, Watson LR. Sensory experiences questionnaire: discriminating sensory features in young children with autism, developmental delays, and typical development. *J Child Psychol Psychiatr*. 2006; 47(6): 591-601.

Bates JM, Raffi HM, Prasadán K, Mascarenhas R, Laszik Z, Maeda N, et al. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int*. 2004; 65(3): 791-797.

Bauer M, Suppmann S, Meyer M, Hesslinger C, Gasser T, Widmer H. R et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor upregulates GTP-cyclohydrolase I activity and tetrahydrobiopterin levels in primary dopaminergic neurones. *J Neurochem*. 2002; 82(5): 1300-1310.

Beach TG. A Review of biomarkers for neurodegenerative disease: will they swing us across the valley? *Neurol Ther*. 2017; 6(1): 5-13.

Bekkers JM. Enhancement by histamine of NMDA-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Science*. 1993; 261(5117): 104-106.

Bianchi MT, Clark AG, Fisher JL. The wake-promoting transmitter histamine preferentially enhances  $\alpha$ -4 subunit-containing GABAA receptors. *Neuropharmacology*. 2011; 61(4): 747-752.

Bing DH, Almeda S, Isliker H, Lahav J, Hynes RO. Fibronectin binds to the C1q component of complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982; 79(13): 4198-4201.

Billstedt E, Gillberg IC, Gillberg C. Autism in adults: symptom patterns and early childhood predictors. Use of the DISCO in a community sample followed from childhood. *J Child Psychol Psychiatry*. 2007; 48(11): 1102-1110.

Bleuler E. *Dementia praecox oder gruppe der Schizophrenien*. Leipzig: Deuticke; 1911.



Block KP, Harper AE. High levels of dietary amino and branched-chain alpha-keto acids alter plasma and brain amino acid concentrations in rats. *J Nutr.* 1991; 121(5): 663-671.

Boehm G, Cervantes H, Georgi G, Jelinek J, Sawatzki G, Wermuth B, et al. Effect of increasing dietary threonine intakes on amino acid metabolism of the central nervous system and peripheral tissues in growing rats. *Pediatr Res.* 1998; 44(6): 900-906.

Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC. The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis.* 1996; 127(1): 1-11.

Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, et al. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 9191-9194.

Bolte ER. Autism and clostridium tetani. *Med Hypotheses.* 1998; 51(2): 133-144.

Bosa C. (2002). Autismo: atuais interpretações para antigas observações. In: C. R. Baptista, C. Bosa (Orgs.). *Autismo e educação: reflexões e propostas de intervenção* (pp. 21-39). Porto Alegre: Artmed. <Disponível em: <http://peadinclu.sao.pbworks.com/f/palestracleonice.pdf>>. Acesso em: 15/07/2017.

Bowers MA, Aicher LD, Davis HA, Woods JS. Quantitative determination of porphyrins in rat and human urine and evaluation of urinary porphyrin profiles during mercury and lead exposures. *J Lab Clin Med.* 1992; 120(2): 272-281.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-254.

Bradley B, Feinerman J. "Amino acid profiling clinical guidelines for determination of preferred specimen choice." *Townsend letter for doctors and patients: the examiner of medical alternative.* 2003; 245: 38-42. Disponível em: < <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.629.713&rep=rep1&type=pdf>> Acesso em: 5/10/2017.

Braissant O, Henry H. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review. *J Inherit Metab Dis.* 2008; 31(2): 230-239.

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 (DF): 2014.

Braverman ER, Pfeiffer CC, Blum K. The healing nutrients within: facts, findings, and new research on amino acids. 3ª ed. Nashville; 2003.

Bröer S, Bröer A, Hansen JT, Bubb WA, Balcar VJ, Nasrallah FA, et al. Alanine metabolism, transport, and cycling in the brain. *J Neurochem.* 2007; 102(6): 1758-1770.

Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, Cheyne C, Clayton-Smith J, García-Fiñana M, et al. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children pre-natally exposed to antiepileptic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013; 84(6): 637-643.

Brunoni D, Mercadante M, Schwartzman JS. Transtornos do espectro do autismo. In: Lopes AC. Clínica médica. Diagnóstico e tratamento. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Editora Atheneu; 2014.

Camargos Jr W coordenador. Transtornos invasivos do desenvolvimento: 3º Milênio. 2ª ed. Brasília: CORDE; 2005.

Campbell DB, Buie TM, Winter H, Bauman M, Sutcliffe JS, Perrin JM, et al. Distinct genetic risk based on association of MET in families with co-occurring autism and gastrointestinal conditions. *Pediatrics.* 2009; 123(3): 1018-1024.

Carroll M, Dyer J, Sossin WS. Serotonin increases phosphorylation of synaptic 4EBP through TOR, but eukaryotic initiation factor 4E levels do not limit somatic cap-dependent translation in aplysia neurons. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(22): 8586-8598.

Castagné V, Moënnos D, Finot PA, Maire JC. Effects of diet-induced hyperthreoninemia. I). Amino acid levels in the central nervous system and peripheral tissues. *Life Sci.* 1993; 53(24): 1803-1810.

Caterino M, Zacchia M, Costanzo M, Bruno G, Arcaniolo D, Trepiccione F, et al. Urine proteomics revealed a significant correlation between urine-fibronectin abundance and estimated-GFR decline in patients with Bardet-Biedl Syndrome. *Kidney Blood Press Res.* 2018; 43(2): 389-405.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of - autism spectrum disorders - autism and developmental disabilities monitoring network, six sites, United States, 2000. *MMWR Surveill Summ.* 2007; 56(1): 1-11.

Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry.* 2005;162(6): 1133-1141.

Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues Clin Neurosci.* 2012; 14(3): 281-292.

Chen YP, Cheng YF, Li XH, Yang WL, Wen C, Zhuang S, et al. Effects of threonine supplementation on the growth performance, immunity, oxidative status, intestinal integrity, and barrier function of broilers at the early age. *Poult Sci.* 2017; 96(2): 405-413.

Cheng N, Rho JM, Masino SA. Metabolic dysfunction underlying autism spectrum disorder and potential treatment approaches. *Front Mol Neurosci.* 2017; 10: 34.

Chittiprol S, Venkatasubramanian G, Neelakantachar N, Babu SV, Reddy NA, Shetty KT, et al. Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: a longitudinal study. *J Psychiatr Res.* 2010; 44(5): 310-313.

Christensen DL, Baio J, Braun KV, Bilder D, Charles J, Constantino NJ et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ.* 2016; 65(-3): 1-23.

Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev.* 1990; 70(1): 43-77.

Cohen M, Fruitier-Arnadin I, Piot JM. Hemorfins: substrates and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Hemorfins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorfins and DPPIV. *Biochimie.* 2004; 86(1): 31-37.

Cole JT. Metabolism of BCAAs. In: Rajendram R, Preedy VR, Patel V. *Branched chain amino acids in clinical nutrition.* New York: Nutrition and Health, Springer Science+Business Media; 2015. p. 13-24. v.1.

Comeaux MS, Wang J, Wang G, Kleppe S, Zhang VW, Schmitt ES, et al. Biochemical, molecular, and clinical diagnoses of patients with cerebral creatine deficiency syndromes. *Mol Genet Metab.* 2013; 109(3): 260-268.

- Constantino JN, Todd RD. Autistic traits in the general population: a twin study. *Arch Gen Psychiatry*. 2003; 60(5): 524-530.
- Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*. 1997; 48: 489-509.
- Cooke JP. The pivotal role of nitric oxide for vascular health. *Can J Cardiol*. 2004; 20(Suppl B): 7B-15B.
- Corbett BA, Kantor AB, Schulman H, Walker WL, Lit L, Ashwood P. A, et al. A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins. *Mol Psychiatry*. 2007; 12(3): 292-306
- Costedio MM, Hyman N, Mawe GM. Serotonin and its role in colonic function and in gastrointestinal disorders. *Dis Colon Rectum*. 2007; 50(3): 376-388.
- Coutinho AM, Oliveira G, Morgadinho T, Fesel C, Macedo TR, Bento C, et al. Variants of the serotonin transporter gene (SLC6A4) significantly contribute to hyperserotonemia in autism. *Mol Psychiatry*. 2004; 9(3): 264-271.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol*. 1960; 150: 656-682.
- D'Aniello S, Somorjai IML, Garcia-Fernandez J, Topo E, D'Aniello A. D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. *FASEB Journal*. 2011; 25(3): 1014-1027.
- Danysz W, Parsons CG. Glycine and N-Methyl-d-Aspartate Receptors: Physiological Significance and Possible Therapeutic Applications. *Pharmacol Rev*. 1998; 50: 597-664.
- Darisipudi MN, Thomasova D, Mulay SR, Brech D, Noessner E, Liapis H, Anders HJ. Uromodulin triggers IL-1 $\beta$ -dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(11): 178 -1789.
- Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 508(1): 1-12.
- De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazzanetti DI, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One*. 2013; 8(10): e76993.

Decramer S, Peredo AG, Breuil B, Mischak H, Monsarrat B, Bascands J, et al. Urine in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7(10): 1850-1862.

Delwing D, Delwing D, Bavaresco CS, Wyse AT. Protective effect of nitric oxide synthase inhibition or antioxidants on brain oxidative damage caused by intracerebroventricular arginine administration. *Brain Res*. 2008; 1193: 120-127.

Despert JL. Schizophrenia in children. *Psychiatri Q*. 1938; 12: 366-371.

Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev*. 2012; 22(3): 229-237.

Dhossche D, Applegate H, Abraham A, Maertens P, Bland L, Bencsath A, et al. Elevated plasma gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in autistic youngsters: stimulus for a GABA hypothesis of autism. *Med Sci Monit*. 2002; 8(8): 1-6.

Dietert RR, Dietert JM, Dewitt JC. Environmental risk factors for autism. *Emerg Health Threats J*. 2011; 4:7111. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/figure/10.3402/ehj.v4i0.7111?scroll=top&needAccess=true>>. Acesso em: 10/08/2017.

Djukic M, Mildner A, Schmidt H, Czesnik D, Bruck W, Priller J, et al. Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain*. 2006; 129(9): 2394-2403.

Do TT, Hindlet P, Waligora-Dupriet A J, Kapel N, Neveux, N, Mignon V, et al. Disturbed intestinal nitrogen homeostasis in a mouse model of high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014; 306(6): E668-E680.

Dohan FC, Grasberger JC. Relapsed schizophrenics: earlier discharge from the hospital after cereal-free, milk-free diet. *Am J Psychiatry*. 1973; 130(6): 685-688.

Dohan FC. Cereals and schizophrenia, data and hypothesis. *Acta Psychiatr Scand*. 1966; 42(2): 125-152.

Dohan FC. More on celiac disease as a model for schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1983; 18(5): 561-564.

Dong YW, Jiang WD, Liu Y, Wu P, Jiang J, Kuang SY, et al. Threonine deficiency decreased intestinal immunity and aggravated inflammation associated with NF- $\kappa$ B and target of rapamycin signalling pathways in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Aeromonas hydrophila*. *Br J Nutr*. 2017; 118(2): 92-108.

D'Sa C, Hirayama K, West A, Hahn M, Zhu M, Kapatoss G. Tetrahydrobiopterin biosynthesis in C6 glioma cells: induction of GTP cyclohydrolase I gene expression by lipopolysaccharide and cytokine treatment. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 41(1-2): 105-110.

During MJ, Acworth IN, Wurtman RJ. Effects of systemic L-tyrosine on dopamine release from rat corpus striatum and nucleus accumbens. *Brain Res*. 1988; 452(1-2): 378-380.

Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers A, et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem*. 2000; 267(17): 5608-5613.

Duval D, Demangel C, Munier-Jolain K, Miossec S, Geahel I. Factors controlling cell proliferation and antibody production in mouse hybridoma cells: I. Influence of the amino acid supply. *Biotechnol Bioeng*. 1991; 38(6): 561-570.

Elder JH. The gluten-free, casein-free diet in autism: an overview with clinical implications. *Nutr Clin Pract*. 2008; 23(6): 583-588.

Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcín C, et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res*. 2012; 5(3): 160-179.

Enstrom AM, Lit L, Onore CE, Gregg JP, Hansen RL, Pessah IN, et al. Altered gene expression and function of peripheral blood natural killer cells in children with autism. *Brain Behav Immun*. 2009; 23(1): 124-133.

Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(1): 64-71.

Errico F, Nisticò R, Palma G, Federici M, Affuso A, Brilli E, et al. Increased levels of d-aspartate in the hippocampus enhance LTP but do not facilitate cognitive flexibility. *Mol Cell Neurosci*. 2008a; 37(2): 236-246.

Errico F, Rossi S, Napolitano F, Catuogno V, Topo E, Fisone G et al. D-aspartate prevents corticostriatal long-term depression and attenuates schizophrenia-like symptoms induced by amphetamine and MK-801. *J Neurosci*. 2008b; 28(41): 10404-10414.

Eto I, Bandy MD, Butterworth CE Jr. Plasma and urinary levels of biopterin, neopterin, and related pterins and plasma levels of folate in infantile autism. *J Autism Dev Disord.* 1992; 22(2): 295-308.

Evans C, Dunstan RH, Rothkirch T, Roberts TK, Reichelt KL, Cosford R et al. Altered amino acid excretion in children with autism. *Nutr Neurosci.* 2008; 11(1): 9-17.

Fernstrom JD, Faller DV. Neutral amino acids in the brain: changes in response to food ingestion. *J Neurochem.* 1978; 30(6): 1531-1538.

Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr.* 2007; 137(6 Suppl 1): 1539S-1547S.

Fernstrom JD. Branched-chain amino acids and brain function. *J Nutr.* 2005; 135(6 Suppl): 1539S-1546S.

Fernstrom MH, Fernstrom JD. Effect of chronic protein ingestion on rat central nervous system tyrosine levels and in vivo tyrosine hydroxylation rate. *Brain Res.* 1995; 672(1-2): 97-103.

Fernstrom MH, Fernstrom JD. Protein consumption increases tyrosine concentration and in vivo tyrosine hydroxylation rate in the light-adapted rat retina. *Brain Res.* 1987; 401(2): 392-396.

Fernstrom MH, Volk EA, Fernstrom JD. In vivo inhibition of tyrosine uptake into rat retina by large neutral but not acidic amino acids. *Am J Physiol.* 1986; 251(4 Pt 1): E393-E399.

Field D, Garlan M, Williams, K. Correlates of specific childhood feeding problems. *J Paediatr Child Health.* 2003; 39(4): 299-304.

Folstein S, Rutter M. Genetic influences and infantile autism. *Nature.* 1997; 265: 726-728.

Franscini N, Blau N, Walter RB, Schaffner A, Schoedon G. Critical role of interleukin-1beta for transcriptional regulation of endothelial 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 50-53.

Furlano RI, Anthony A, Day R, Brown A, McGarvey L, Thomson MA, et al. Colonic CD8 and gamma delta T-cell infiltration with epithelial damage in children with autism. *J Pediatr.* 2001; 138(3): 366-372.

Gabriele S, Sacco R, Cerullo S, Neri C, Urbani A, Tripi G, et al. Urinary p-cresol is elevated in young french children with autism spectrum disorder: a replication study. *Biomarkers*. 2014; 19(6): 463-470.

Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. *J Pediat-Brazil*. 2004; 80(2supl): 83-94.

Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K, et al. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis*. 2008; 30(3): 303-311.

García-Horsman JA, Männistö PT, Venäläinen JI. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*. 2007; 41(1): 1-24.

Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Perinatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009; 195(1): 7-14.

Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*. 2011; 128(2): 344-355.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010; 327: 656-661.

Geschwind DH. Autism: many genes, common pathways? *Cell*. 2008; 135(3): 391-395.

Gibson CJ. Dietary control of retinal dopamine synthesis. *Brain Res*. 1986; 382(1): 195-198.

Gilberg C, Trygstad O, Foss I. Childhood psychosis and urinary excretion of peptides and protein-associated peptide complexes. *J Autism Dev Disord*. 1982; 12(3): 229-241.

Gillberg C, Terenius L, Lönnerholm G. Endorphin activity in childhood psychosis. Spinal fluid levels in 24 cases. *Arch Gen Psychiatry*. 1985; 42(8): 780-783.

Glaeser BS, Melamed E, Growdon JH, Wurtman RJ. Elevation of plasma tyrosine after a single oral dose of L-tyrosine. *Life Sci*. 1979; 25: 265-271.

Gogas KR, Hough LB. Inhibition of naloxone-resistant antinociception by centrally administered H2-antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989; 248(1): 262-267.



Goldberg K. Autismo: uma perspectiva histórico - evolutiva. R Ci Hum. 2005; 6(6): 181-196.

Goldman-Rakic PS, Muly EC, Williams GV. D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. Brain Res Brain Res Rev. 2000; 31(2-3): 295-301.

Gonzales RA, Brown LM. Brain regional differences in glycine reversal of ethanol-induced inhibition of N-methyl-D-aspartate-stimulated neurotransmitter release. Life Sci. 1995; 56(8): 571-577.

Good P. Do salt cravings in children with autistic disorders reveal low blood sodium depleting brain taurine and glutamine? Med Hypotheses. 2011; 77(6): 1015-1021.

Goodwin MS, Cowen MA, Goodwin TC. Malabsorption and cerebral dysfunction: a multivariate and comparative study of autistic children. J Autism Child Schizophr. 1971; 1(1): 48-62.

Goossens FJ, Wauters JG, Vanhoof GC, Bossuyt PJ, Schatteman KA, Loens K, et al. Subregional mapping of the human lymphocyte prolyl oligopeptidase gene (PREP) to human chromosome 6q22. Cytogenet Cell Genet. 1996; 74(1-2): 99-101.

Gravani AP. Biomimetização de diferentes superfícies de titânio com fibronectina [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto militar de engenharia; 2010.

Growdon JH, Nader TM, Schoenfeld J, Wurtman RJ. L-threonine in the treatment of spasticity. Clin Neuropharmacol. 1991; 14(5): 403-412.

Gupta S, Aggarwal S, Rathanravan B, Lee T. Th1- and Th2-like cytokines in CD4+ and CD8+ T cells in autism. J. Neuroimmunol. 1998; 85(1): 106-109.

Gustafson JM, Dodds SJ, Burgus RC, Mercer LP. Prediction of brain and serum free amino acid profiles in rats fed graded levels of protein. J Nutr. 1986; 116(9): 1667-1681.

Haas HL, Sergeeva OA, Selbach O. Histamine in the nervous system. Physiol Rev. 2008; 88(3): 1183-1241.

Hagberg L, Cinque P, Gisslen M, Brew BJ, Spudich S, Bestetti A, et al. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. AIDS Res Ther. 2010; 7: 15.

Hammer VA, Rogers QR, Freeland RA. Threonine is catabolized by L-threonine 3-dehydrogenase and threonine dehydratase in hepatocytes from domestic cats. J Nutr. 1996; 126(9): 2218-2226.

- Harrison KL, Pheasant AE. Analysis of urinary pterins in autism. *Biochem Soc Trans.* 1995; 23(4): 603S.
- Hatton GI, Yang QZ. Synaptically released histamine increases dye coupling among vasopressinergic neurons of the supraoptic nucleus: mediation by H1 receptors and cyclic nucleotides. *J Neurosci.* 1996; 16(1): 123-129.
- Hauser SL, Doolittle TH, Lopez-Bresnahan M, Shahani B, Schoenfeld D, Shih VE, et al. An antispasticity effect of threonine in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 1992; 49 (9): 923-926.
- Herndon AC, Di Giuseppe C, Johnson SL, Leiferman J, Reynolds A. Does nutritional intake differ between children with autism spectrum disorders and children with typical development? *J Autism Dev Disord.* 2009; 39(2): 212-222.
- Herschkowitz N. Brain development in fetus, neonate and infant. *Biol Neonat.* 1988; 54(1): 1-19.
- Hoeffler CA, Klann Eric. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trend Neurosci.* 2010; 33(2): 67-75.
- Horvath K, Papadimitriou JC, Rabsztyn A, Drachenberg C, Tildon JT. Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *J Pediatr.* 1999; 135(5): 559-563.
- Hough LB. Histaminergic mechanisms of antinociception. In G. D. Prell. *Histamine in Neurobiology.* Clifton, NJ: Humana Press; 1998 (in press).
- Hough LB. Histamine actions in the central nervous system. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, et al. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28245/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28245/). Acesso em: 10/11/2018.
- Hsiao EY. Gastrointestinal issues in autism spectrum disorder. *Harv Rev Psychiatry.* 2014; 22(2): 104-111.
- Hsu CL, Lin CY, Chen CL, Wang CM, Wong MK. The effects of a gluten and casein-free diet in children with autism: a case report. *Send to Chang Gung Med J.* 2009; 32(4): 459-465.
- Hunter C, Doi K, Wenthold RJ. Neurotransmission in the auditory system. *Otolaryngol Clin North Am.* 1992; 25(5): 1027-1052.

Irazusta J, Larrinaga G, González-Maeso J, Gil J, Meana JJ, Casis L. Distribution of prolyl endopeptidase activities in rat and human brain. *Neurochem Int.* 2002; 40(4): 337-345.

Ishii M, Shimizu S, Wajima T, Hagiwara T, Negoro T, Miyazaki A, et al. Reduction of GTP cyclohydrolase I feedback regulating protein expression by hydrogen peroxide in vascular endothelial cells. *J Pharmacol Sci.* 2005; 97(2): 299-302.

Jacob K, Egeler E, Hennel B, Lupp P. Coproporphyrin isomers II and IV are normal constituents of human urine. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989; 27(9): 659-661.

Jacquemont S, Coe BP, Hersch M, Duyzend MH, Krumm N, Bergmann S, et al. A higher mutational burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. *Am J Hum Genet.* 2014; 94(3): 415-425.

Janecka A, Fichna J, Janecki T. Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem.* 2004; 4(1): 1-17.

Jarmołowska B, Bielikowicz K, Iwan M, Sidor K, Kostyra E, Kaczmarski M. Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. *Peptides.* 2007; 28(3): 678-682.

Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, Meininger CJ, Wu G. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J Nutr Biochem.* 2006; (9): 571-588.

Johansson C, Schmidt DN, Hellström PM. Changed integrated gastrointestinal response to a mixed meal in exocrine pancreatic insufficiency. *Pancreas.* 1992; 7(2): 205-211.

Johnston MV. Neurotransmitters and vulnerability of the developing brain. *Brain Dev.* 1995; 17(5): 301-306.

Jiang Y, Tang J, Xie M, Wen ZG, Qiao SY, Hou SS. Threonine supplementation reduces dietary protein and improves lipid metabolism in Pekin ducks. *Br Poult Sci.* 2017; 58(6): 687-693.

Kalantari S, Jafari A, Moradpoor R, Ghasemi E, Khalkhal E. Human urine proteomics: analytical techniques and clinical applications in renal diseases. *Int J Proteomics.* 2015; 2015: 782798.

Kalat JW. Speculations on similarities between autism and opiate addiction. *J Autism Child Schizophr.* 1978; 8(4): 477-479.

Kałużna-Czaplińska J, Michalska M, Rynkowski J. Homocysteine level in urine of autistic and healthy children. *Acta Biochim Pol.* 2011; 58(1): 31-34.

Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child.* 1943; 2: 217-250.

Kanner L. Early infantile autism. *J Pediatr.* 1944; 25: 211-217.

Kantarcioglu AS, Kiraz N, Aydin A. Microbiota-gut-brain axis: yeast species isolated from stool samples of children with suspected or diagnosed autism spectrum disorders and in vitro susceptibility against nystatin and fluconazole. *Mycopathologia.* 2016; 181(1-2): 1-7.

Kato T, Okada M, Nagatsu T. Distribution of post-proline cleaving enzyme in human brain and the peripheral tissues. *Mol Cell Biochem.* 1980. 20; 32(3): 117-121.

Kaufman S, Friedman S. Dopamine-beta-hydroxylase. *Pharmacol Rev.* 1965; 17: 71-100.

Kaufman S, Kaufman EE. Tyrosine hydroxylase. In: Blakley RL, Benkovic SJ editors. *Folates and pterins. 2nd vol. Chemistry and biochemistry of the pterins.* New York: John Wiley and Sons; 1985. p. 251-352.

Kierszenbaum A L, Tres I. *Histologia e biologia celular- Uma introdução à patologia.* 3<sup>a</sup> ed. Elsevier/ Medicina Nacionais. p. 122-124, 2012.

Kim HW, Cho SC, Kim JW, Cho IH, Kim AS, Park M, et al. Family-based association study between NOS-I and -IIA polymorphisms and autism spectrum disorders in Korean trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009; 150B(2): 300-306.

Kim SW, Mateo RD, Yin YL, Wu G. Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2007; 20(2): 295-306

Kim YS, Leventhal BL. Genetic epidemiology and insights into interactive genetic and environmental effects in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry.* 2015; 77(1): 66-74.

Kjaer A, Knigge U, Rouleau A, Garbarg M, Warberg J. Dehydration-induced release of vasopressin involves activation of hypothalamic histaminergic neurons. *Endocrinology*. 1994; 135(2): 675-681.

Kletke O, Sergeeva OA, Lorenz P, Oberland S, Meier JC, Hatt H, et al. New insights in endogenous modulation of ligand-gated ion channels: histamine is an inverse agonist at strychnine sensitive glycine receptors. *Eur J Pharmacol*. 2013; 710(1-3): 59-66.

Klin A. Autismo e síndrome de Asperger: uma visão geral. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006; 28(Supl I): 3-11.

Klintwall L, Holm A, Eriksson M, Carlsson LH, Olsson MB, Hedvall A, et al. Sensory abnormalities in autism. A brief report. *Res Dev Disabil*. 2011; 32(2): 795-800.

Knigge U, Matzen S, Bach FW, Bang P, Warberg J. Involvement of histaminergic neurons in the stress-induced release of pro-opiomelanocortin-derived peptides in rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1989; 120(4): 533-539.

Knigge U, Warberg J. The role of histamine in the neuroendocrine regulation of pituitary hormone secretion. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991; 124(6): 609-619.

Knivsberg AM, Reichelt KL, Høien T, Nødland M. A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutr Neurosci*. 2002; 5(4): 251-261.

Kolter T. Ganglioside biochemistry. *ISRN Biochem*. 2012; 2012: 506160.

Kolvin I. Infantile autism or infantile psychoses. *Br Med J*. 1972; 3: 753-755

Koneru A, Satyanarayana S, Rizwan S. Endogenous opioids: their physiological role and receptors. *GJP*. 2009; 3(3): 149-153.

Koufaris C, Sismani C. Modulation of the genome and epigenome of individuals susceptible to autism by environmental risk factors. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(4): 8699-8718.

Kraly FS, Keefe ME, Tribuzio RA, Kim YM, Finkell J, Braun CJ. H1, H2, and H3 receptors contribute to drinking elicited by exogenous histamine and eating in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 53(2): 347-354.

Krigsman A, Boris M, Goldblatt A, Stott C. Clinical presentation and histologic findings at ileocolonoscopy in children with autistic spectrum disorder and chronic gastrointestinal symptoms. *Autism Insights*. 2010; 2: 1-11.

Künkel FW. Die Kindheitsentwicklung der Schizophrenen. *Monat Psychiatr Neurol*. 1920; 48: 254-272.

Kuwabara H, Yamasue H, Koike S, Inoue H, Kawakubo Y, Kuroda M et al. Altered metabolites in the plasma of autism spectrum disorder: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectroscopy study. 2013. *PLoS One*; 8(9):e73814.

Landrigan PJ. What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Curr Opin Pediatr*. 2010; 22(2): 219-225.

Langlais PJ, Zhang SX, Weilersbacher G, Hough LB, Barke KE. Histamine-mediated neuronal death in a rat model of Wernicke's encephalopathy. *J Neurosci Res*. 1994; 38(5): 565-574.

Leboyer M, Bouvard MP, Recasens C, Philippe A, Guilloud-Bataille M, Bondoux D, et al. Difference between plasma N- and C-terminally directed beta-endorphin immunoreactivity in infantile autism. *Am J Psychiatry*. 1994; 151(12): 1797-1801.

Leboyer M, Philippe A, Bouvard M, Guilloud-Bataille M, Bondoux D, Tabuteau F, et al. Whole blood serotonin and plasma betaendorphin in autistic probands and their first-degree relatives. *Biol Psychiatry*. 1999; 45(2): 158-163.

Lee K, Patterson V, Roberts G, Trimble E. The antispastic effect of L-threonine. In: Lubec G, Rosenthal GA. *Amino acids: chemistry, biology and medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1990. p. 658-663.

Leekam SR, Nieto C, Libby SJ, Wing L, Gould J. Describing the sensory abnormalities of children and adults with autism. *J Autism Dev Disord*. 2007; 37(5): 894-910.

Lehnert H, Reinstein DK, Strowbridge BW, Wurtman RJ. Neurochemical and behavioral consequences of acute, uncontrollable stress: effects of dietary tyrosine. *Brain Res*. 1984; 303(2): 215-223.

Lekman A, Skjeldal O, Sponheim E, Svennerholm L. Gangliosides in children with autism. *Scand J Paediatr*. 1995; 84(7): 787-790.

Li DF, Xiao CT, Qiao SY, Zhang JH, Johnson EW, Thacker PA. Effects of dietary threonine on performance, plasma parameters and immune function of growing pigs. *Anim Feed Sci Technol*. 1999; 78(3-4): 179-188.

Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, et al. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol*. 2009; 207(1-2): 111-116.

Li XA, Everson W, Smart EJ. Nitric oxide, caveolae, and vascular pathology. *Cardiovasc Toxicol*. 2006; 6(1): 1-13.

Libbey JE, Fujinami RS. Role for antibodies in altering behavior and movement. *Autism Res*. 2010; 3(4): 147-152.

Lima RC. A construção histórica do autismo (1943-1983). *Ci Huma e Soc em Ver*. 2014; 36(1): 109-123.

Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G, Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC, et al. Involvement of histaminergic neurons in arousal mechanisms demonstrated with H3-receptor ligands in the cat. *Brain Res*. 1990; 523(2): 325-330.

Liu Y, Mo L, Goldfarb DS, Evan AP, Liang F, Khan SR, et al. Progressive renal papillary calcification and ureteral stone formation in mice deficient for Tamm-Horsfall protein. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 299(3): 469-478.

Liu P, Jing Y, Collie ND, Dean B, Bilkey DK, Zhang H. Altered brain arginine metabolism in schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2016; 6: e871.

Lucarelli S, Frediani T, Zingoni AM, Ferruzzi F, Giardini O, Quintieri F, et al. Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med*. 1995; 37(3): 137-141.

Lukens CT, Linscheid TR. Development and validation of an inventory to assess mealtime behavior problems in children with autism. *J Autism Dev Disord*. 2008; 38(2): 342-352.

Lyall R, Schmidt RJ, Hertz-Picciotto I. Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. *Int J Epidemiol*. 2014; 43(2): 443-464.

Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev*. 2004; 84(4): 1051-1095.

Lyons V, Fitzgerald M. Asperger (1906 - 1980) and Kanner (1894 - 1981), the two pioneers of autismo. *J Autism Dev Disord*. 2007; 37(10): 2022-2023.

- Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003; 17(20): 2337-2342.
- Manabe R, Ohe N, Maeda T, Fukuda K, Sekiguchi K. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol*. 1997; 139(1): 295-307.
- Manocha M, Khan WI. Serotonin and GI disorders: an update on clinical and experimental studies. *Clin Transl Gastroenterol*. 2012; 3(4): e13.
- Masi A, DeMayo MM, Glozier N, Guastella AJ. An overview of autism spectrum disorder, heterogeneity and treatment options. *Neurosci Bull*. 2017; 33(2): 183-193.
- Maudsley H. The insanity of early life. In: *The pathology of mind*. 3<sup>rd</sup> ed. Londres: Macmillan and Co; 1878. p. 256-295.
- Mayes SD, Calhoun SL. Symptoms of autism in young children and correspondence with the DSM. *Infants Young Child*. 1999; 12(2): 90-97.
- Mazurec MO, Vasa RA, Kalb LG, Kanne SM, Rosenberg D, Keefer A. Anxiety, sensory over-responsivity, and gastrointestinal problems in children with autism spectrum disorders. *J Abnorm Child Psychol*. 2013; 41(1): 165-176.
- McTavish SF, Cowen PJ, Sharp T. Effect of a tyrosine-free amino acid mixture on regional brain catecholamine synthesis and release. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999; 141(2): 182-188.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. 1999; 30(85): 9-24.
- Messahel S, Pheasant AE, Pall H, Ahmed-Choudhury J, Sungum- Paliwal RS, Vostanis P. Urinary levels of neopterin and biopterin in autism. *Neurosci Lett*. 1998; 241(1): 17-20.
- Micanovic R, Chitteti BR, Dagher PC, Srour EF, Khan S, Hato T, et al. Tamm-Horsfall protein regulates granulopoiesis and systemic neutrophil homeostasis. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26(9): 2172 - 2182.
- Miles JH. Autism spectrum disorders-agenetics review. *Genet Med*. 2011; 13(4): 278-294.



Miller LJ, Fuller DA. Sensational kids: hope and help for children with sensory processing disorder, Penguin Group Inc., New York, NY, USA, 2006.

Ming X, Stein TP, Barnes V, Rhodes N, Guo L. Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: a metabolomics study. *J Proteome Res.* 2012; 11(12): 5856-5862.

Molloy CA, Manning-Courtney P. Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and autistic spectrum disorders. *Autism.* 2003; 7(2): 165-171.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329(27): 2002-2012.

Monteleone I, Monteleone G, Fina D, Caruso R, Petruzzello C, Calabrese E, et al. A functional role of flip in conferring resistance of Crohn's disease lamina propria lymphocytes to FAS-mediated apoptosis. *Gastroenterology.* 2006; 130(2): 389-397.

Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, et al. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol Psychiatry.* 2010; 68(4): 368-376.

Morris SM Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22: 87-105.

Mostafa GA, Al-Ayadhi LY. Increased serum levels of anti-ganglioside M1 auto-antibodies in autistic children: relation to the disease severity. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 39.

Mulder EJ, Anderson GM, Kema IP, de Bildt A, van Lang ND, den Boer JA. Platelet serotonin levels in pervasive developmental disorders and mental retardation: diagnostic group differences, within-group distribution, and behavioral correlates. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2004; 43(4): 491-499.

Muly EC, Szigeti K, Goldman-Rakic PS. D<sub>1</sub> Receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: distribution and subcellular localization. 1998; 18(24): 10553-10565.

Munk DD, Repp AC. Behavioral assessment of feeding problems of individuals with severe disabilities. *J Appl Behav Anal.* 1994; 27(2): 241-250.

Murin R, Hamprecht B. Branched-chain amino acids and brain metabolism. In: Packer L, Sies H, Eggersdorfer M, Cadenas E. Micronutrients and brain health. Boca Raton: CRC Press; 2009. p. 403- 460.

Murín R, Hamprecht B. Metabolic and regulatory roles of leucine in neural cells. *Neurochem Res.* 2008; 33(2): 279-284.

Mutig K, Kahl T, Saritas T, Godes M, Persson P, Bates J. Activation of the bumetanide-sensitive Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. *Biol Chem.* 2011; 286(34): 30200-30210.

Nadal-Desbarats L, Aïdoud N, Emond P, Blasco H, Filipiak I, Sarda P, et al. Combined <sup>1</sup>H-NMR and <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC-NMR to improve urinary screening in autism spectrum disorders. *Analyst.* 2014; 139(13): 3460-3468.

Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem.* 1964; 239: 2910-2917.

Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide.* 2006; 15(4): 265-279.

Nardin JM. Atividades biológicas da uleína. [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.

Nataf R, Skorupka C, Amet L, Lam A, Springbett A, Lathe R. Porphyrinuria in childhood autistic disorder: implications for environmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016; 214(2): 99-108.

Naushad SM, Jain JM, Prasad CK, Naik U, Akella RR. Autistic children exhibit distinct plasma amino acid profile. *Indian J Biochem Biophys.* 2013; 50(5): 474-478.

Neggers YH. Increasing prevalence, changes in diagnostic criteria, and nutritional risk factors for autism spectrum disorders. *ISRN Nutrition.* 2014; 2014: 514026.

Nellis MM, Kasinski A, Carlson M, Allen R, Schaefer AM, Schwartz EM, et al. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. *Mol Genet Metab.* 2003; 80(1-2): 189-195.

NIH Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69(3): 89-95.

- Nissen JD, Lykke K, Bryk J, Stridh MH, Zaganas I, Skytt DM , et al. Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes. *Glia*. 2017; 65(3): 474-488.
- Noto A, Fanos V, Barberini L, Grapov D, Fattuoni C, Zaffanello M, et al. The urinary metabolomics profile of an italian autistic children population and their unaffected siblings. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014; 27(Suppl2): 46-52.
- Nuutinen S, Panula P. Histamine in neurotransmission and brain diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 709: 95-107.
- O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, et al. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet*. 2008; 40(9): 1053-1055.
- Onodera K, Yamatodani A, Watanabe T, Wada H. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Prog Neurobiol*. 1994; 42(6): 685-702.
- Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun*. 2012; 26(3): 383-392.
- Ookuma K, Sakata T, Fukagawa K, Yoshimatsu H, Kurokawa M, Machidori H, et al. Neuronal histamine in the hypothalamus suppresses food intake in rats. *Brain Res*. 1993; 628(1-2): 235-242.
- Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011; 3(1Suppl): S7-S19.
- Orlowski M, Wilk E, Pearce S, Wilk S. Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit brain. *J Neurochem*. 1979; 33(2): 461-469.
- Ota A, Kaneko YS, Mori K, Nakashima A, Nagatsu I, Nagatsu T. Effect of peripherally administered lipopolysaccharide (LPS) on GTP cyclohydrolase I, tetrahydrobiopterin and norepinephrine in the locus coeruleus in mice. *Stress*. 2007; 10(2): 131-136.
- Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a baby siblings research consortium study. *Pediatrics*. 2011; 128(3): 488-495.
- Paakkari I, Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med*. 1995; 27: 369-377.

Panksepp J. A neurochemical theory of autism. 1979; 2: 174-177.

Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol.* 2005; 54(Pt10): 987-991.

Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 2006; 147(Suppl 1): S127-S135.

Paula CS, Ribeiro SH, Fombonne E, Mercadante MT. brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in brazil: a pilot study. *J Autism Dev Disord.* 2011; 41(12): 1738-1742.

Paulovich AG, Whiteaker JR, Hoofnagle AN, Wang P. The interface between biomarker discovery and clinical validation: The tar pit of the protein biomarker pipeline. *Proteomics Clin Appl.* 2008; 2(10-11):1386-1402.

Pejcic M, Stojnev S, Stefanovic V. Urinary proteomics - a tool for biomarker discovery. *Ren Fail.* 2010; 32(2): 259-268.

Perry TL, Hansen S, Christie RG. Amino compounds and organic acids in CSF, plasma, and urine of autistic children. *Biol Psychiatry.* 1978; 13(5): 575-586.

Peters B, Williams KC, Gorrindo P, Rosenberg D, Lee EB, Levitt P, et al. Rigid-compulsive behaviors are associated with mixed bowel symptoms in autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord.* 2014; 44(6): 1425-1432.

Peters JC, Harper AE. Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism. *J Nutr.* 1985; 115(3): 382-398.

Phillipu A. Interactions with other neuron systems. In: T. Watanabe T, Wada H. *Histaminergic neurons: morphology and function.* Boca Raton: CRC Press; 1991. p. 323-344.

Pisitkun T, Rose JR, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics.* 2006; 5(10): 1760-1771.

Plaitakis A, Spanaki C, Mastorodemos V, Zaganas I. Study of structure-function relationships in human glutamate dehydrogenases reveals novel molecular mechanisms for the regulation of the nerve tissue-specific (GLUD2) isoenzyme. *Neurochem Int.* 2003; 43(4-5): 401-410.

Plaitakis A, Metaxari M, Shashidharan P. Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: implications for biologic function. *J Neurochem.* 2000; 75(5): 1862-1869.

Potenza MA, Nacci C, Mitolo-Chieppa D. Immunoregulatory effects of L-arginine and therapeutical implications. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2001; 1(1): 67-77.

Potter HW. Schizophrenia in children. *Am J Psychiatry.* 1933; 89: 1253-1270.

Puig-Alcaraz C, Fuentes-Albero M, Calderón J, Garrote D, Cauli O. Increased homocysteine levels correlate with the communication deficit in children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Res.* 2015; 229(3): 1031-1037.

Ramsey JM, Guest PC, Broek JA, Glennon JC, Rommelse N, Franke B, et al. Identification of an age-dependent biomarker signature in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Mol Autism.* 2013; 4(1): 27.

Ranjan S, Nasser JA. Nutritional status of Individuals with autism spectrum disorders: do we know enough? *Adv Nutr.* 2015; 6(4): 397-407.

Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(13): 7037-7044.

Reichelt KL, Bioengineer DT, Knivsberg A, Brønstad G. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. *Microb Ecol Health Dis.* 2012; 23: 10.3402/mehd.v23i0.18958.

Reichelt KL, Hole K, Hamberger A, Saelid G, Edminson PD, Braestrup CB, et al. Biologically active peptide-containing fractions in schizophrenia and childhood autism. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1981; 28: 627-643.

Reichelt KL, Knivsberg AM. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutr Neurosci.* 2003; 6(1): 19-28.

Reichelt WH, Knivsberg AM, Nødland M, Stensrud M, Reichelt KL. Urinary peptide levels and patterns in autistic children from seven countries and the effect of dietary intervention after four years. *Dev Brain Dysfunc.* 1997; 10(1): 44-55.

Renigunta A, Renigunta V, Saritas T, Decher N, Mutig K, Waldegger S J. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *Biol Chem*. 2011; 286(3): 2224 - 2235.

Rimland B. *Infantile Autism: The syndrome and its implications for a neural theory of behavior*. New York: Appleton-Century-Crofts: 1964.

Roberts EL. The support of energy metabolism in the central nervous system with substrates other than glucose. In: Lajtha A, Gibson GE, Dienel GA. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*. Boston: Springer; 2007. p. 137-179.

Rogers SJ, Hepburn S, Wehner E. Parent reports of sensory symptoms in toddlers with autism and those with other developmental disorders. *J Autism Dev Disord*. 2003; 33 (6): 631-642.

Rolf LH, Haarmann FY, Grottemeyer KH, Kehrer H. Serotonin and amino acid content in platelets of autistic children. *Acta Psychiatr Scand*. 1993; 87(5): 312-316.

Ronald A, Happè F, Price TS, Baron-Cohen S, Plomin R. Phenotypic and genetic overlap between autistic traits at the extremes of the general population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2006; 45(10): 1206-1214.

Ronald A, Hoekstra RA. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011; 156B(3): 255-274.

Rosen NJ, Yoshida CK, Croen LA. Infection in the first 2 years of life and autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2007; 119 (1): 61- 69.

Rose WC. The nutritional significance of the amino acids. *Physiol Rev*. 1938; 18: 109-136.

Ross DL, Klyklo WM, Hitzemann R. Reduction of elevated CSF b-endorphin by fenfluramine in infantile autism. *Pediatr Neurol*. 1987; 3(2): 83-86.

Rosseneu S. Aerobic gut flora in children with autism spectrum disorder and gastrointestinal symptoms. In: *Defeat autism now conference*; October 3, 2003; San Diego (CA).

Rossignol DA, Frye RE. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2012; 17(3): 290-314.

Russo AJ, Krigsman A, Jepson B, Wakefield A. Decreased sérum hepatocyte growth factor (HGF) in autistic children with severe gastrointestinal disease. *Biomark Insights* 2009; 4: 181-190.

Rutter M. Childhood schizophrenia reconsidered. *J Autism Child Schizophr.* 1972; 2: 315-337.

Rydon R. Profiles of the nutrients Ñ1. Carbohydrate, lipid and protein. Morrisville: Lulu.com; 2016.

Sacco R, Curatolo P, Manzi B, Militerni R, Bravaccio C, Frolli A. Principal pathogenetic components and biological endophenotypes in autism spectrum disorders. *Autism Res.* 2010; 3(5): 237-252.

Säemann MD, Weichhart T, Zeyda M, Staffler G, Schunn M, Stuhlmeier KM, et al. Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a toll-like receptor-4-dependent mechanism. *J Clin Invest.* 2005; 115(2): 468-475.

Saito M, Sugiyama K. Tissue-specific expression of c-series gangliosides in the extraneural system. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1474(1): 88-92.

Sakai K , Homma H , Lee JA , Fukushima T , Santa T , Tashiro K , et al. Emergence of D-aspartic acid in the differentiating neurons of the rat central nervous system. *Brain Res.* 1998; 808(1): 65-71.

Sakata T, Kurokawa M, Oohara A, Yoshimatsu H. A physiological role of brain histamine during energy deficiency. *Brain Res Bull.* 1994; 35(2): 135-139.

Sakata T, Yoshimatsu H. Homeostatic maintenance regulated by hypothalamic neuronal histamine. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1995; 17 Suppl C: 51-56.

Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, et al. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(6): 1497-1500.

Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil KM, et al. X-linked creatine transporter defect: an overview. *J Inherit Metab Dis.* 2003; 26(2-3): 309-318.

Salvatore E, Rinaldi C, Tucci T, Di Maio L, Di Somma C, Savastano S, et al. Growth hormone response to arginine test differentiates between two subgroups of Huntington's disease patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011; 82(5): 543-547.

Sanctuary MR, Kain JN, Angkustsiri K, German JB. Dietary considerations in autism spectrum disorders: the potential role of protein digestion and microbial putrefaction in the gut-brain axis. *Front Nutr*. 2018; 5: 40.

Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *JAMA*. 2014; 311(17): 1770-1777.

Sanes DH, Choski P. Glycinergic transmission influences the development of dendrite shape. *Neuroreport*. 1992; 3(4): 323-326.

Saras A, Gisselmann G, Vogt-Eisele AK, Erlkamp KS, Kletke O, Pusch H, et al. Histamine action on vertebrate GABAA receptors: direct channel gating and potentiation of GABA responses. *J Biol Chem*. 2008; 283(16): 10470-10475.

Saresella M, Marventano I, Guerini FR, Mancuso R, Ceresa L, Zanzottera M, et al. An autistic endophenotype results in complex immune dysfunction in healthy siblings of autistic children. *Biol Psychiatry*. 2009; 66(10): 978-984.

Schain RJ, Freedman DX. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J Pediatr*. 1961; 58: 315-320.

Schwartzman JS. Neurobiologia dos transtornos do espectro do autismo. In: Schwartzman JS. *Transtornos do espectro do autismo*. São Paulo: Memnon; 2011. p. 65-111.

Schell MJ, Cooper OB, Snyder SH. D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(5): 2013 - 2018.

Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, et al. Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96(1): 80-89.



Schulze A, Bauman M, Tsai AC, Reynolds A, Roberts W, Anagnostou E, et al. Prevalence of creatine deficiency syndromes in children with nonsyndromic autism. *Pediatrics*. 2016; 137(1): 1-9.

Schulze A, Hess T, Wevers R, Mayatepek E, Bachert P, Marescau B, et al. Creatine deficiency syndrome caused by guanidinoacetate methyltransferase deficiency: diagnostic tools for a new inborn error of metabolism. *J Pediatr*. 1997; 131(4): 626-631.

Schulze A. Creatine deficiency syndromes. *Handb Clin Neurol*. 2013; 113: 1837-1843.

Schulze A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem*. 2003; 244(1-2): 143-150.

Seim AR, Reichelt KL. An enzyme/brain-barrier theory of psychiatric pathogenesis: unifying observations on phenylketonuria, autism, schizophrenia and postpartum psychosis. *Med Hypotheses*. 1995; 45(5): 498-502.

Senegas-Balas F, Bastie MJ, Balas D, Escourrou J, Bommelaer G, Bertrand C, et al. Histological variations of the duodenal mucosa in chronic human pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 1982; 27(10): 917-922.

Shanahan MR, Venturini AJ, Daiss JL, Friedman AE. Peptide diagnostic markers for human disorders. European Patent Application 2000; EP 0 969 015 A2: 1-44.

Shattock P, Kennedy A, Rowell F, Berney TP. Role of neuropeptides in autism and their relationships with classical neurotransmitters. *Brain Dysfunc*. 1990; 3(5): 328-345.

Shattock P, Whiteley P. Biochemical aspects in autism spectrum disorders: updating the opioid-excess theory and presenting new opportunities for biomedical intervention. *Expert Opin Ther Targets*. 2002; 6(2): 175-183.

Shinohe A, Hashimoto K, Nakamura K, Tsujii M, Iwata Y, Tsuchiya KJ, et al. Increased serum levels of glutamate in adult patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2006; 30(8): 1472-1477.

Shimmura C, Suda S, Tsuchiya KJ, Hashimoto K, Ohno K, Matsuzaki H, et al. Alteration of plasma glutamate and glutamine levels in children with high-functioning autism. *PLoS One*. 2011; 6(10): e25340.

Singh Y, Swaroop A, Misra VK. Kidney lipids of weanling rats fed lysine threonine deficient rice diets. *Nutr Rep Int.* 1979; 20 (1): 75-77.

Smith MW, Phillips AD. Abnormal expression of dipeptidylpeptidase IV activity in enterocyte brush-border membranes of children suffering from coeliac disease. *Exp Physiol.* 1990; 75: 613-616.

Smith QR. Regulation of amino acid transport at the blood-brain barrier. In: Huether G. *Amino acid availability and brain function in health and disease.* Berlin: Springer Verlag; 1988. p. 421-429.

Sokolov O, Kost N, Andreeva O, Korneeva E, Meshavkin V, Tarakanova Y, et al. Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides.* 2014; 56: 68-71.

Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(11): 6459-6465.

Spector S, Gordon R, Sjoerdsma A, Udenfriend S. End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis. *Mol Pharmacol.* 1967; 3(6): 549-555.

Spencer RF, Wenthold RJ, Baker R. Evidence for glycine as an inhibitory neurotransmitter of vestibular, reticular, and prepositus hypoglossi neurons that project to the cat abducens nucleus. *J Neurosci.* 1989; 9(8): 271827-271836.

Ssucharewa GE. Die schizoiden psychopathien im kindesalter. *monatsschr. Psychiatr Neurol.* 1926; 60: 235-261.

Stöckler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, et al. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res.* 1994; 36(3): 409-413.

Strimbu K, Tavel, JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010; 5(6): 463-466.

Stromberger C, Bodamer OA, Stöckler-Ipsiroglu S. Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2003; 26(203): 299-308.

Strömmland K, Nordin V, Miller M, kerstrom B, Gillberg C. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol.* 1994; 36(4): 351-356.

Stubbs EG, Crawford M L. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. *J Autism Child Schizophr.* 1977; 7(1): 49-55.

Surén P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz D, et al. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *JAMA.* 2013; 309(6): 570-577.

Sutcliffe JS, Delahanty RJ, Prasad HC, McCauley JL, Han Q, Jiang L. Allelic heterogeneity at the serotonin transporter locus (SLC6A4) confers susceptibility to autism and rigid-compulsive behaviors. *Am J Hum Genet.* 2005; 77(2): 265-279.

Talay-Ongan A, Wood K. Unusual sensory sensitivities in autism: a possible crossroads. *Int J Disabil Dev Educ.* 2000; 47(2): 201-212.

Talkowski ME, Rosenfeld JA, Blumenthal I, Pillalamarri V, Chiang C, Heilbut A. Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell.* 2012; 149(3): 525-537.

Tam SY, Elsworth JD, Bradberry CW, Roth RH. Mesocortical dopamine neurons: high basal firing frequency predicts tyrosine dependence of dopamine synthesis. *J Neural Transm Gen Sect.* 1990; 81(2): 97-110.

Tashiro M, Yanai K. [Molecular imaging of histamine receptors in the human brain]. *Brain Nerve.* 2007; 59(3): 221-231.

Taylor WL, Andrews PC, Henrikson CK, Dixon JE. New fluorogenic substrates for a rat brain proline endopeptidase. *Anal Biochem* 1980; 105(10): 58-64.

Thiels E, Barrionuevo G, Berger TW. Excitatory stimulation during postsynaptic inhibition induces long-term depression in hippocampus in vivo. *J Neurophysiol.* 1994; 72(6): 3009-3016.

Thongboonkerd V, et al. Proteomics of human urine. In: Thongboonkerd V. Proteomics of human body fluids: principles, methods, and applications. Nova lorque: Humana Press; 2007. p. 225-268.

Tirouvanziam R, Obukhanych TV, Laval J, Aronov PA, Libove R, Banerjee AG, et al. Distinct plasma profile of polar neutral amino acids, leucine, and glutamate in children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 2012; 42(5): 827-836.

- Tomchek SD, Dunn W. Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. *Am J Occup Ther.* 2007; 61(2):190-200.
- Torrente F, Anthony A, Herushkel RB, Thompson MA, Ashwood P, Murch SH. Focal-enhanced gastritis in regressive autism with features distinct from Crohn's and helicobacter pylori gastritis. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99(4): 598-605.
- Torrente F, Ashwood P, Day R, Machado N, Furlano RI, Anthony A, et al. Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Mol Psychiatry.* 2002; 7(4): 375-382.
- Tu WJ, Chen H, He J. Application of LC-MS/MS analysis of plasma amino acids profiles in children with autism. *J Clin Biochem Nutr.* 2012; 51(3): 248-249.
- Valicenti-McDermott MD, McVicar K, Cohen HJ, Wershil BK, Shinnar S. Gastrointestinal symptoms in children with an autism spectrum disorder and language regression. *Pediatric Neurol.* 2008; 39(6): 392-398.
- Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 2005; 57(1): 67-81.
- Verhoeven NM, Salomons GS, Jakobs C. Laboratory diagnosis of defects of creatine biosynthesis and transport. *Clin Chim Acta.* 2005; 361(1-2): 1-9.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica : a vida em nível molecular.* 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.
- Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature.* 2011; 474(7351): 380-384.
- Vojdani A, Bazargan M, Vojdani E, Samadi J, Nourian AA, Eghbalieh N, et al. Heat shock protein and gliadin peptide promote development of peptidase antibodies in children with autism and patients with autoimmune disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11(3): 515-524.
- Vojdani A, Campbell AW, Anyanwu E, Kashanian A, Bock K, Vojdani E. Antibodies to neuron-specific antigens in children with autism: possible cross-reaction with encephalitogenic proteins from milk, *Chlamydia pneumoniae* and *Streptococcus group A.* *J Neuroimmunol.* 2002; 129(1-2): 168-177.

Vojdani A, Mumper E, Granpeesheh D, Mielke L, Traver D, Bock K, et al. Low natural killer cell cytotoxic activity in autism: the role of glutathione, IL-2 and IL-15. *J Neuroimmunol*. 2008; 205(1-2): 148-154.

Vojdani A, Pangborn JB, Vojdani E, Cooper EL. Infections, toxic chemicals and dietary peptides binding to lymphocyte receptors and tissue enzymes are major instigators of autoimmunity in autism. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2003; 16(3): 189-199.

Volkmar F R, McPartland J C. From Kanner to DSM-5: autism as an evolving diagnostic concept. *Annu Rev Clin Psychol*. 2014; 10: 193-212.

Wada H, Inagaki N, Yamatodani A, Watanabe T. Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity? *Trends Neurosci*. 1991; 14(9): 415-418.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: The 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*. 1992; 281(Pt1): 21-40.

Wallimann T. Bioenergetics. Dissecting the role of creatine kinase. *Curr Biol*. 1994; 4(1): 42-46.

Wang L, Angley MT, Gerber JP, Sorich MJ. A review of candidate urinary biomarkers for autism spectrum disorder. *Biomarkers*. 2011; 16(7): 537-552.

Wang L, Angley MT, Gerber JP, Young RL, Abarno DV, McKinnon RA, et al. Is urinary indolyl-3-acryloylglycine a biomarker for autism with gastrointestinal symptoms? *Biomarkers*. 2009; 14(8): 596-603.

Wang YE, Esbensen P, Bentley D. Arginine kinase expression and localization in growth cone migration. *J Neurosci*. 1998; 18(3): 987-998.

Warren RP, Foster A, Margaretten NC. Reduced natural killer cell activity in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1987; 26(3): 333-335.

Watanabe Y, Kojima-Kumatsu T, Iwaki-Egawa A, Fujimoto Y. Increased excretion of proline-containing peptides in dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1993; 81(3): 323-350.

Watling RL, Deitz J, White O. Comparison of sensory profile scores of young children with and without autism spectrum disorders. *Am J Occup Ther*. 2001; 55(4): 416-423.

Weiss LA, Abney M, Cook EH, Ober C. Sex-specific genetic architecture of whole blood serotonin levels. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(1): 33-41.

White JF. Intestinal pathophysiology in autism. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003; 228(6): 639-649.

Whiteley P, Haracopos D, Knivsberg AM, Reichelt KL, Parlar S, Jacobsen J, et al. The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr Neurosci.* 2010; 13(2): 87-100.

Whiteley P, Waring R, Williams L, Klovrsza L, Nolan F, Smith S, et al. Spot urinary creatinine excretion in pervasive developmental disorders. *Pediatr Int.* 2006; 48(3): 292-297.

Williams BL, Hornig M, Parekh T, Lipkin WI. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *MBio.* 2012; 3(1): e00261-11.

Wing L. The History of ideas on autism legends, myths and reality. *Autism.* 1997; 3(1): 13-23.

Wolff S. The history of autism. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2004; 13(4): 201-208.

Wolosker H, D'Aniello A, Snyder SH. D-aspartate disposition in neuronal and endocrine tissues: ontogeny, biosynthesis and release. *Neuroscience.* 2000; 100(1): 183 -189.

Woods JS, Armel SE, Fulton DI, Allen J, Wessels K, Simmonds PL. Urinary porphyrin excretion in neurotypical and autistic children. *Environ Health Perspect.* 2010; 118(10): 1450-1457.

Woods JS, Bowers MA, Davis HA. Urinary porphyrin profiles as biomarkers of trace metal exposure and toxicity: studies on urinary porphyrin excretion patterns in rats during prolonged exposure to methyl mercury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 110(3): 464-476.

Woods JS, Echeverria D, Heyer NJ, Simmonds PL, Wilkerson J, Farin FM. The association between genetic polymorphisms of coproporphyrinogen oxidase and an atypical porphyrinogenic response to mercury exposure in humans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 206(2): 113-120.

Woods JS, Kardish RM. Developmental aspects of hepatic heme biosynthetic capability and hematotoxicity-II. Studies on uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem Pharmacol.* 1983; 32(1): 73-78.

Woods JS, Martin MD, Naleway CA, Echeverria D. Urinary porphyrin profiles as a biomarker of mercury exposure: studies on dentists with occupational exposure to mercury vapor. *J Toxicol Environ Health.* 1993; 40(2-3): 235-246.

World Health Organization. The ICD-10 Classification of mental and behavioural disorders: Clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: 1992.

Wu L, Morris SM Jr . Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998; 336 (Pt 1): 1-17.

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000; 80(3): 1107-1213.

Xiong X, Liu D, Wang Y, Zeng T, Peng Y. Urinary 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, and 3-hydroxyhippuric acid are elevated in children with autism spectrum disorders. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 9485412.

Yang L, Rudser K, Golnik A, Wey A, Higgins LA, Gourley GR. Urine protein biomarker candidates for autism. *J Proteomics Bioinform.* 2016; 14: 1-7.

Yap IK, Angley M, Veselkov KA, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls. *J Proteome Res.* 2010; 9(6): 2996-3004.

Yoshimoto T, Ogita K, Walter R, Koida M, Tsuru D. Post-proline cleaving enzyme. Synthesis of a new fluorogenic substrate and distribution of the endopeptidase in rat tissues and body fluids of man. *Send to Biochim Biophys Acta.* 1979; 569(2): 184-192.

Young JG, Cohen DJ, Brown SL, Caparulo BK. Decreased urinary free catecholamines in childhood autism. *J Am Acad Child Psychiatry.* 1978; 17(4): 671-678.

Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci.* 2011; 60(10): 537-544.

Zheng HF, Wang WQ, Li XM, Rauw G, Baker GB. Body fluid levels of neuroactive amino acids in autism spectrum disorders: a review of the literature. *Amino Acids*. 2017; 49(1): 57-65.

Zoroğlu SS, Yürekli M, Meram I, Söğüt S, Tutkun H, Yetkin O, et al. Pathophysiological role of nitric oxide and adrenomedullin in autism. *Cell Biochem Funct*. 2003; 21(1): 55-60.



*Anexos*



## Anexo I



## APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/12/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 449/11 intitulado: “**RELAÇÃO ENTRE SÍNDROME DO ESPECTRO AUTISTA E CONSUMO DE PROTEÍNAS**” apresentado pelo Instituto Butanta.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

**Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Ivo Lebrun**  
**Pesquisador (a) Executante: Ms. Nádia Isaac da Silva**

CEP-FMUSP, 14 de dezembro de 2012.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Paulo Marchiori".

**Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori**  
Vice-Coordenador interino  
Comitê de Ética em Pesquisa

## Anexo II

### INSTITUTO BUTANTAN

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE

---

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA E RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M  F  
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE .....  
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F  
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

---

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Relação entre síndrome do espectro autista e consumo de proteínas
2. PESQUISADOR Responsável: Prof. Dr. Ivo Lebrun  
CARGO/FUNÇÃO: Diretor da Divisão de Desenvolvimento Científico  
INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: Instituto Butantan
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:  
RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO   
RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 45 meses

Vimos por este pedir seu consentimento para que a criança com da síndrome do espectro autista que está sob sua responsabilidade participe da pesquisa “**Relação entre hábito alimentar e síndrome do espectro autista**”.

O autista que está sob sua responsabilidade foi escolhido por ser portador da síndrome do espectro autista e estar na faixa etária entre 3 a 10 anos. A participação do autista não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir e retirar seu consentimento para que ele participe. Sua recusa não trará nenhum prejuízo ao autista e tão quanto, sua relação com o pesquisador ou com a instituição. O tratamento na clínica em hipótese alguma será prejudicado ou suspenso.

O objetivo desse estudo é estabelecer uma relação entre o consumo de alimentos que contém as proteínas glúten e caseína e quadro clínico do autismo.

A participação do autista nesta pesquisa consistirá em fazer exame de urina, avaliação psicológica, levantamento de hábito alimentar e avaliação do estado nutricional.

Para a análise de cetonas, urobilinogênio, bilirrubina, densidade específica, hemoglobina, pH, leucócitos, nitrito, proteínas e glicose a primeira urina do dia deverá ser coletada em coletor universal estéril e depois ser colocada em um recipiente com gelo. Logo em seguida deverá ser entregue na clínica onde o autista faz o tratamento. Nesse local a pesquisadora fará o teste com a fita de reagente imediatamente após o recebimento. Na segunda coleta de urina, a primeira urina do dia será coletada em coletor universal estéril em seguida deverá ser colocado em saco plástico e guardado no congelador da geladeira da casa do participante. No mesmo dia a pesquisadora irá buscar a urina congelada nas casas. As amostras serão colocadas em uma caixa de isopor com gelo seco e serão levadas para o laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan onde serão feitas as análises de peptídeos opioides, compostos de origem proteica, neopterina e biopterina. Os pais ou responsável farão as duas coletas de urina e para que sejam feitas de forma adequada receberão treinamento.

A avaliação psicológica será por método CARS (Childhood Autism Rating Scale). Ela será feita por psicólogo da clínica onde fazem o tratamento. Este teste é baseado em observação do comportamento do autista.

O levantamento de hábito alimentar será feito através de questionário que será respondido por pais ou responsáveis dos autistas. Nele terão perguntas sobre quais alimentos são consumidos pelos autistas e também a frequência.

Para a avaliação do estado nutricional dos autistas serão medidos peso e altura e também será feita a bioimpedância. O exame de bioimpedância tem como objetivo avaliar a quantidade de massa muscular e tecido gorduroso do corpo. O autista será colocado em uma maca, deitado com a barriga para cima, em seguida serão colocados eletrodos nas articulações e dedos médios do braço e perna direita. Em seguida os eletrodos serão conectados ao aparelho para a realização da avaliação. Para o exame ser feito não serão utilizados medicamentos, agulhas ou instrumentos cortantes.

A coleta de urina será feita duas vezes. A avaliação psicológica, o levantamento de hábito alimentar e avaliação do estado nutricional serão feitos apenas uma vez.

A pesquisa não apresenta risco aos participantes, pois todos os exames e avaliações não são procedimentos invasivos.

Como medida preventiva o autista que irá participar do projeto receberá atenção especial na clínica, pois a coleta de urina e o exame de bioimpedância podem mudar a rotina do autista.

O projeto terá a disposição a equipe do centro de tratamento que é formada por terapeuta ocupacional, psicólogo, fonoaudiólogo, pedagogo, professor de educação física, assistente social e monitoras.

O benefício com a participação do autista que está sob sua responsabilidade é a possibilidade de identificar fatores relacionados à dieta que possam contribuir para o agravamento dos sintomas comportamentais e a partir desta constatação criar um tratamento complementar baseado em uma dieta adequada para o autismo.

A família do autista não terá nenhuma despesa para participar da pesquisa, todos os exames serão pagos pelo projeto.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a participação do autista.

Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação do autista. Todas as informações serão registradas em prontuários que serão guardados pelos pesquisadores e somente eles terão acesso às informações.

Você receberá uma cópia deste termo em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais envolvidos na pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ivo Lebrun, que pode ser encontrado no Instituto Butantan. Av: Vital Brazil nº 1500, Cep: 05503-900 São Paulo-SP-Brasil. Telefone (11) 37267222 ramal: 2103. Você também poderá entrar em contato com a pesquisadora Ms. Nádia Isaac da Silva, e-mail: [dii\\_isaac@yahoo.com.br](mailto:dii_isaac@yahoo.com.br). Telefone (19) 30386962/992954025.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP. Av. Dr. Arnaldo, n. 251 - 21º andar – sala 36, bairro Cerqueira César - São Paulo - SP - CEP: 01246-000. Telefones: 3893-4401/3893-4407, e-mail: [cep.fm@usp.br](mailto:cep.fm@usp.br) onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Relação entre síndrome do espectro autista e consumo de proteínas”.

Eu discuti com o Dr. Ivo Lebrun e Ms. Nádia Isaac da Silva sobre a decisão de permitir a participação do autista que está sob minha responsabilidade nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação do autista que está sob minha responsabilidade é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em permitir a participação do autista que está sob minha responsabilidade neste estudo e poderei retirar o consentimento da participação a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que o autista possa ter adquirido, ou no atendimento na clínica que ele recebe tratamento.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## Anexo III

### INSTITUTO BUTANTAN

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO TCLE

---

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA E RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M  F  
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL .....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F  
 DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

---

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Relação entre síndrome do espectro autista e consumo de proteína
2. PESQUISADOR Responsável: Prof. Dr. Ivo Lebrun  
CARGO/FUNÇÃO: Diretor da Divisão de Desenvolvimento Científico  
INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: Instituto Butantan
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:  
RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO   
RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 45 meses



Vimos por este pedir seu consentimento para que a criança que está sob sua responsabilidade participe da pesquisa “**Relação entre hábito alimentar e síndrome do espectro autista**”.

A criança foi escolhida para participar da pesquisa por apresentar desenvolvimento típico (normal) e também ser do mesmo sexo e estar na faixa etária de um autista que irá participar deste projeto. A participação da criança não é obrigatória e qualquer momento você pode desistir e retirar seu consentimento para que ela participe. Sua recusa não trará nenhum prejuízo ao autista e tão quanto, sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo desse estudo é estabelecer uma relação entre o consumo de alimentos que contém as proteínas glúten e caseína e quadro clínico do autismo.

A participação da criança consistirá em fazer o exame de urina, levantamento de hábito alimentar e avaliação do estado nutricional.

Para a análise de cetonas, urobilinogênio, bilirrubina, eritrócitos, hemoglobina, pH, leucócitos, nitrito, albumina e glicose a primeira urina do dia deverá ser coletada em coletor universal estéril e depois ser colocada em um recipiente com gelo. Logo em seguida deverá ser entregue na escola onde a criança estuda. Nesse local a pesquisadora fará o teste com a fita de reagente imediatamente após o recebimento. Na segunda coleta de urina, a primeira urina do dia será coletada em coletor universal estéril em seguida deverá ser colocado em saco plástico e guardado no congelador da geladeira da casa do participante. No mesmo dia a pesquisadora irá buscar a urina congelada nas casas. As amostras serão colocadas em uma caixa de isopor com gelo seco e serão levadas para o laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan onde serão feitas as análises de peptídeos opioides, compostos de origem proteica, neopterina e biopterina. Os pais ou responsável farão as duas coletas de urina e para que sejam feitas de forma adequada receberão treinamento.

O levantamento de hábito alimentar será feito através de questionário que será respondido por pais ou responsáveis das crianças participantes. Nele terão perguntas sobre quais alimentos são consumidos e também a frequência.

Para a avaliação do estado nutricional serão medidos peso e altura e também será feita a bioimpedância. O exame de bioimpedância tem como objetivo avaliar a quantidade de massa muscular e tecido gorduroso do corpo. O participante será

colocado em uma maca, deitado com a barriga para cima, em seguida serão colocados eletrodos nas articulações e dedos médios do braço e perna direita. Em seguida os eletrodos serão conectados ao aparelho para a realização da avaliação. Para o exame ser feito não serão utilizados medicamentos, agulhas ou instrumentos cortantes.

A coleta de urina será feita duas vezes. A avaliação psicológica, o levantamento de hábito alimentar e avaliação do estado nutricional serão feitos apenas uma vez.

A pesquisa não apresenta risco aos participantes, pois o exame não é um procedimento invasivo.

Os benefícios com a participação da criança que está sob sua responsabilidade é a possibilidade de auxiliar na identificação de fatores relacionados à dieta ou processos inflamatórios que possam contribuir para o agravamento dos sintomas comportamentais e a partir desta constatação criar um tratamento complementar baseado em uma dieta adequada para o autismo.

A família da criança não terá nenhuma despesa para participar da pesquisa, todos os exames serão pagos pelo projeto.

Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a identificação da criança. Todas as informações serão registradas em prontuário que serão guardados pelos pesquisadores e somente eles terão acesso às informações.

Você receberá uma cópia deste termo em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais envolvidos na pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Ivo Lebrun, que pode ser encontrado no Instituto Butantan USP/SP. Av: Vital Brazil nº 1500, Cep: 05503-900 São Paulo-SP-Brasil. Telefone (11) 37267222 ramal: 2103. Você também poderá entrar em contato com a pesquisadora Ms. Nádia Isaac da Silva, e-mail: [dii\\_isaac@yahoo.com.br](mailto:dii_isaac@yahoo.com.br). Telefone (19) 30386962.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP. Av. Dr. Arnaldo, n. 251 - 21º andar – sala 36, bairro Cerqueira César - São Paulo - SP - CEP: 01246-000. Telefones: 3893-4401/3893-4407, e-mail: [cep.fm@usp.br](mailto:cep.fm@usp.br)

onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Relação entre síndrome do espectro autista e consumo de proteínas”.

Eu discuti com o Dr. Ivo Lebrun e Ms. Nádia Isaac da Silva sobre a decisão de permitir a participação da criança que está sob minha responsabilidade nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação da criança é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em permitir a participação da criança que está sob minha responsabilidade neste estudo e poderei retirar o consentimento da participação a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda.

-----

Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

-----

Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----

Assinatura do responsável pelo estudo Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## Anexo IV

### Materiais

#### Equipamentos

- Centrífuga (Sorvall Super speed RC2-B)
- Banho-seco (Accu block Digital Dry Bath, Labnet)
- Espectrofotômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices®)
- Sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) (LC-20AT Shimadzu®)
- Coluna C<sub>18</sub> 250mm x 4.6.7µm
- Coluna C18 (Discovery C18, 5 µm, 50 mm x 2.1 mm)
- Espectrômetro de Massas do tipo Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI – TOF/TOF) (Axima Performance, Shimadzu®)
- Sistema UFLC binário (20A Prominence, Shimadzu Co., Japan)
- Espectrômetro de Massas do tipo Electrospray - Ion Trap - Time of Flight (ESI-IT-TOF) (Shimadzu Co., Japão).

#### Lista de insumos e reagentes

- Água de alta pureza (18,2MΩ.cm) purificada com sistema de filtração Milli-Q (Millipore®)
- kit comercial Creatinine (Laborlab Ltda®)
- kit BioRad protein assay (BioRad®)
- Soroalbumina bovina (Sigma Aldrich®)

- Tampão de amostra
  - 350 mM de Tris/HCl
  - 10% de SDS
  - 30% de glicerol
  - 1,2 mg de azul de bromofenol
  - 9,3% de 2-mercaptoetanol
- Azul de Coomassie R-250
- Solução ácido acético
  - ácido acético 10%
  - metanol 10%
- Padrão de massa molecular (10-250 kDa) Precision Plus Protein Unstained Protein Standards (Bio-Rad®)
- Ácido acético glacial 100%
- Solução de EDTA (pH 8,0)
- solução derivatizante
  - etanol 70%
  - Trietilamina 10%
  - Fenilisotiocianato 10%
- Solução tampão
  - Acetato de sódio 19 gr
  - Água Milli-Q 1000 mL
  - Trietilamina 0,5 mL
  - Solução de EDTA 200 $\mu$ L (pH 8,0)
- Acetonitrila – ACN
- Ácido trifluoroacético – TFA

- Filtro de PVDF 45  $\mu\text{m}$  (Millipore®)
- Ponteira do tipo Zip Tip C<sub>18</sub> (Millipore®)
- Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), matriz
- kit MALDI TOFMIX TM (LaserBio Labs®)