

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES PARA DIAGNÓSTICO DE
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA POR ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR**

SUZANA FERREIRA DE PAULA SILVA

**UBERLÂNDIA
2020**

SUZANA FERREIRA DE PAULA SILVA

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES PARA DIAGNÓSTICO DE
TRANSTORNO DE ESPECTRO AUTISTA POR ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira

UBERLÂNDIA

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 Silva, Suzana Ferreira de Paula, 1974-
2020 AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES PARA
DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DE ESPECTRO AUTISTA POR
ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR [recurso eletrônico] / Suzana Ferreira
de Paula Silva. - 2020.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.

Coorientador: Walter Luiz Siqueira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.407>

Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas. I. Silva, Robinson Sabino da, 1981-,
(Orient.). II. Siqueira, Walter Luiz, 1977-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902 Telefone: 34
 3225-8628 - www.ppcsa.famed.ufu.br - copme@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 012/PSCSA				
Data:	28.04.2020	Hora de início:	09:00h	Hora de encerramento:	13:00h
Matrícula do Discente:	11812CSD036				
Nome do Discente:	Suzana Ferreira de Paula Silva				
Título do Trabalho:	AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES PARA DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DE ESPECTRO AUTISTA POR ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	3: Fisiopatologia das doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Patofisiologia e diagnóstico salivar de doenças crônico-degenerativa				

Reuniu-se em web conferência pela plataforma Mconf-RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Thays Crosara Abrahão Cunha (FACSETE), Tales Lyra de Oliveira (USCS) e Robinson Sabino da Silva (UFU) orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ul mada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do tulo de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação per nente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thays Crosara Abrahão Cunha, Usuário Externo**, em 28/04/2020, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Presidente**, em 28/04/2020, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2015478** e o código CRC **EE1E369F**.

Referência: Processo nº 23117.028769/2020-32 SEI nº 2015478

*A meus pais, meu irmão, meu esposo e minhas
filhas que sempre me incentivaram na busca por
crescimento pessoal e profissional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelas oportunidades que colocou em meu caminho.

A meus pais, Maria José e Valtuir, e ao meu irmão Sérgio agradeço a confiança depositada na minha capacidade, a assistência e o incentivo. Ao meu esposo Vanilson e às minhas filhas Amanda e Gabriela, pela compreensão em todos os momentos de ausência, pelas palavras amigas e por comemorarem comigo cada etapa vencida.

Ao Prof. Dr. Robinson Sabino Silva, minha admiração e respeito pela dedicada orientação, pela sabedoria, paciência e serenidade na condução deste estudo, pelos ensinamentos e motivação durante o mestrado. Ao coorientador Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira pelo conhecimento compartilhado.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Tales, Dr.^a Thays e Dr. Mário pela atenção e considerações prestadas a este estudo.

Aos profissionais dos laboratórios Léia e Douglas pelo aprendizado e auxílio no desenvolvimento desta pesquisa, à Prof.^a Simone sempre disposta a ajudar.

À Késia que antes mesmo do ingresso no mestrado, me incentivou, confiou em mim e juntamente com a Prof.^a Fabiana foram importantes para a realização deste estudo.

Aos residentes sempre prontos para auxiliar com os participantes deste estudo, em especial a Fernanda que esteve ao meu lado em várias etapas do estudo.

Aos coordenadores e colegas de trabalho do Setor de Pacientes Especiais (SEPAE-UFU) e da Prefeitura Municipal de Ituiutaba, pela compreensão, amizade e apoio.

À Universidade Federal de Uberlândia que disponibilizou sua infraestrutura para a realização deste estudo. Aos responsáveis pelo Hospital Odontológico e Hospital de Clínicas da UFU e Unidades de Saúde da Prefeitura Municipal de Uberlândia que permitiram a realização do estudo nestes espaços.

Às bibliotecárias Shirley e Yara pela atenção e auxílio.

A todos os meus colegas de pós-graduação agradeço o apoio, o compartilhamento de conhecimento, a divisão de trabalho durante o mestrado, em especial ao Rafael, Lorena, Caio, Érica, Marcelo.

Aos participantes do estudo, obrigada pela disponibilidade, pela confiança depositada na ciência, sem vocês não seria possível a realização do estudo.

A todos que participaram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

À FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo incentivo financeiro para o desenvolvimento deste estudo.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos.”*

Marcel Proust

RESUMO

Introdução: O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma síndrome do neurodesenvolvimento com diagnóstico obtido por observações clínicas e avaliações comportamentais. Atualmente, faltam métodos de diagnóstico baseados em biomarcadores, tornando o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico precisas e adequadas para o TEA um desafio. A redução do tempo de espera para o diagnóstico do TEA pode antecipar o início de intervenções propiciando melhores resultados. Portanto, a busca por uma plataforma de diagnóstico econômica, não invasiva, sustentável (sem reagentes) e precisa é relevante para o diagnóstico do TEA. **Objetivo:** Estabelecer assinatura espectral infravermelha salivar no TEA que possibilite o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico baseadas em sistema Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR). **Material e métodos:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e analisou o perfil salivar de 53 participantes, 19 com diagnóstico de TEA e 34 neurotípicos (NT), com idades entre 2 e 20 anos, utilizando espectroscopia ATR-FTIR em regiões com espectro eletromagnético entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . A sensibilidade e especificidade dos modos vibracionais foram avaliados pela curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC). **Resultados:** Três modos vibracionais salivares do grupo TEA foram diferencialmente expressos ($p < 0,05$) em comparação aos NT. Esses modos vibracionais foram pré-validados como potenciais biomarcadores espectrais de diagnóstico pela análise da curva ROC. A área da banda do modo vibracional 2935 ($2942 - 2895\text{ cm}^{-1}$) apresentou sensibilidade de 73,68% e especificidade de 79,41% ($p = 0,012$) comparado com os NT, e acurácia de 76,5%. As áreas da banda do modo vibracional 1636 ($1738 - 1581\text{ cm}^{-1}$) do grupo TEA apresentaram sensibilidade de 68,42% e especificidade de 73,53% ($p = 0,0032$) em comparação com a área do NT, e do modo vibracional 986 ($1005 - 959\text{ cm}^{-1}$) exibiu sensibilidade de 50% e especificidade de 73,68% ($p = 0,0493$). **Conclusão:** Os biomarcadores espectrais salivares descobertos usando análise univariada podem apoiar uma nova alternativa robusta para o diagnóstico complementar de TEA, a partir de uma plataforma de tecnologia sustentável, com volume ultra reduzido de amostra, coleta não invasiva e sem utilização de reagentes, o que contribui para a tomada de decisões médicas e favorece o início da intervenção indicada.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista. Biomarcador. Saliva. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Diagnóstico.

ABSTRACT

Introduction: Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental syndrome diagnosed by clinical observations and behavioral assessments. Currently, diagnostic methods based on biomarkers are lacking, making the development of accurate and appropriate diagnostic tools for ASD a challenge. The reduction in waiting time for the diagnosis of ASD can anticipate the beginning of interventions, providing better results. Therefore, the search for an economic, non-invasive, sustainable (without reagents) and accurate diagnostic platform is relevant to the diagnosis of ASD. **Objective:** Establish salivary infrared spectral signature in the TEA that allows the development of diagnostic platforms based on Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy system. **Material and methods:** This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) in human beings at the Federal University of Uberlândia (UFU) and analyzed the salivary profile of 53 participants, 19 diagnosed with ASD and 34 neurotypical (NT), with ages between 2 and 20 years, using ATR-FTIR spectroscopy in regions with an electromagnetic spectrum between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} . The sensitivity and specificity of the vibrational modes were evaluated using the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. **Results:** Three salivary vibrational modes in the ASD group were differentially expressed ($p < 0.05$) compared to NT. These vibrational modes have been pre-validated as potential spectral diagnostic biomarkers by analyzing the ROC curve. The band area of the 2935 vibrational mode (2942 - 2895 cm^{-1}) showed a sensitivity of 73.68% and specificity of 79.41% ($p = 0.012$) compared with the NT, and accuracy of 76.5%. The areas of the band in the 1636 vibrational mode (1738 - 1581 cm^{-1}) of the ASD group showed a sensitivity of 68.42% and specificity of 73.53% ($p = 0.0032$) compared to the NT area, and of the vibrational mode 986 (1005 - 959 cm^{-1}) exhibited a sensitivity of 50% and specificity of 73.68% ($p = 0.0493$). **Conclusion:** The salivary spectral biomarkers discovered using univariate analysis can support a new robust alternative for the complementary diagnosis of ASD from a sustainable technology platform, with an ultra-small sample volume, non-invasive collection and without the use of reagents, which contributes for making medical decisions and favors the beginning of the indicated intervention.

Keywords: Autism spectrum disorder. Saliva. Biomarkers. Fourier transform infrared spectroscopy. Diagnosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	Associação Americana de Psiquiatria
Apo	Apoliproteína
ApoA1	Apolipoproteína A-1
ApoA4	Apolipoproteína A-4
ApoE	Apolipoproteína E
ATR-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Total Atenuada
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID	Classificação Internacional de Doenças- Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
cm⁻¹	Centímetros recíprocos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais- DSM-5
EUA	Estados Unidos da América
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-12p4	Interleucina 12p4
IL-8	Interleucina 8
IL-6	Interleucina 6
IL-1β	Interleucina 1 beta

IRDI	Indicadores Clínicos de Risco para o Desenvolvimento Infantil
IV	Infravermelho
M-CHAT	<i>Modified Checklist for Autism in Toddlers</i>
M-CHAT-R	<i>Modified Checklist for Autism in Toddlers - Revisada</i>
miRNAs- microRNAs	Micro ácido ribonucleico
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C-reativa
PON1	Paraoxonase 1
QI	Quocientes de Inteligência
RNase	Ribonuclease
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TGD	Transtornos Globais do Desenvolvimento
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformador beta 1
Th1	<i>T helper 1</i>
TNF-α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	TEA	17
2.1.1	Definição e classificação	17
2.1.2	Prevalência	18
2.1.3	Desenvolvimento	18
2.1.4	Etiologia	19
2.1.5	Diagnóstico	21
2.1.6	Possíveis biomarcadores no TEA	23
2.2	Saliva	24
2.2.1	Saliva como fluido diagnóstico	26
2.3	Possíveis biomarcadores salivares no TEA	27
2.4	FTIR	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	ARTIGO - A sustainable and non-invasive salivary ATR-FTIR platform for complementary diagnostics of autism spectrum disorder	33
	Referências	48

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio do neurodesenvolvimento, que envolve comprometimento no domínio da comunicação social além de comportamentos restritos e repetitivos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). A prevalência de TEA nos Estados Unidos da América (EUA) mostrou um crescimento significativo nas últimas décadas, com relato de uma em cada 59 crianças (BAIO *et al.*, 2018). Considerando a população mundial, a prevalência de TEA relatada em 2012 foi de uma a cada 160 crianças (ELSABBAGH *et al.*, 2012). No entanto, é importante destacar que esta diferença pode estar relacionada com baixa capacidade de diagnóstico, especialmente em países com desenvolvimento reduzido (ELSABBAGH *et al.*, 2012).

O TEA pode ocorrer em todos os grupos raciais, étnicos e socioeconômicos (DURKIN *et al.*, 2010). Em termos de gênero, estudos indicam incidência de três meninos para uma menina (LOOMES; HULL; MANDY, 2017) ou quatro meninos para uma menina (BAIO *et al.*, 2018).

A etiologia do TEA ainda não foi estabelecida (PARDO; EBERHART, 2007). O diagnóstico atualmente é obtido por observações clínicas e avaliações comportamentais (ECKER, 2011) e a idade do diagnóstico tem variado entre 1,5 a 6 anos (LANDA, 2008). É importante ressaltar que a intervenção comportamental é eficaz na redução de incapacidades no TEA (DAWSON *et al.*, 2009) e quanto antes a intervenção iniciar melhor é o benefício (WALLACE; ROGERS, 2010).

Os biomarcadores salivares têm elevado potencial diagnóstico, apresentando alta sensibilidade, tornando a saliva um método diagnóstico preciso para doenças bucais e sistêmicas (ROI *et al.*, 2019). A saliva apresenta vantagens como coleta indolor, não invasiva (MORTHA *et al.*, 2018), oferece menor risco de contaminação para o profissional que a manuseia em relação ao sangue, pode ser coletada em casa pelo próprio paciente (HOFMAN, 2001) e por pessoas com pouco treinamento (KAKARADDI; ATHANI; RAVIKUMAR, 2012), o que a caracteriza como uma amostra biológica apropriada para estudo de biomarcadores no TEA (GALIANA-SIMAL *et al.*, 2018).

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) é uma ferramenta para análise quantitativa

rápida e precisa de componentes salivares, livre de reagentes e utiliza volume mínimo de amostra (KHAUSTOVA *et al.*, 2010; KHAUSTOVA *et al.*, 2009).

O presente estudo se justifica por considerar a relevância de disponibilizar uma plataforma de diagnóstico do TEA baseada em fluidos biológicos, que colabore com a definição do diagnóstico em um menor tempo, é importante ressaltar que quanto antes intervenções comportamentais têm início, melhor é o resultado. Especificamente pela utilização da saliva, plataforma ATR-FTIR apresenta vantagens como método menos invasivo, é livre de reagentes, possibilita um resultado rápido, utilizando volume mínimo de amostra, é preciso e apresenta custo de análise compatível a análises bioquímicas de larga escala utilizadas no sistema público e privado de saúde.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 TEA

2.1.1 Definição e classificação

O TEA é uma síndrome do neurodesenvolvimento, na qual o indivíduo apresenta um comprometimento da comunicação e interação social além de comportamentos restritos e repetitivos. (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) traz a classificação dos transtornos mentais e os critérios para diagnosticá-los. É reconhecida mundialmente como uma ferramenta confiável para diagnóstico. No intuito de melhorar estes critérios diagnósticos, identificar sintomas específicos e direcionar o tratamento, no DSM-5, o Autismo Infantil Precoce, Autismo Infantil, Autismo de Kanner, Autismo de Alto Funcionamento, Autismo Atípico, Transtorno Global do Desenvolvimento sem outras especificações, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno de Asperger estão contidos em um único diagnóstico, o TEA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde 10 (CID-10) é o sistema classificatório atual no Brasil. No CID-10, o autismo está classificado em Transtornos Globais do Desenvolvimento (TGD) (TGD-F84) que estão inseridos em Transtornos do Desenvolvimento Psicológico (F80-89). Os TGD estão caracterizados como: Autismo Infantil (F84.0); Autismo Atípico (F84.1); Síndrome de Rett (F84.2); Transtorno Desintegrativo da Infância (F84.3); Transtorno de Hiperatividade Associado ao Retardo Mental e Movimentos Estereotipados (F84.4); Síndrome de Asperger (F84.5); Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (F84.8); Transtorno Invasivo do Desenvolvimento, não-especificado (F84.9) (WHO, 2016).

O CID-11 entrará em vigor em 2022, no momento encontra-se em fase de revisão. Com a intenção de facilitar o diagnóstico e codificação para acesso a serviços de saúde, o CID-11 agrupa diagnósticos como Autismo Infantil (F84.0); Autismo Atípico (F84.1) e Síndrome de Asperger (F84.5) no diagnóstico de TEA. As subdivisões da classificação do TEA estão relacionadas aos prejuízos na linguagem funcional e à deficiência intelectual, e estes estão inseridos em Distúrbios

do Desenvolvimento Neurológico no CID-11 (WHO, 2019). A estrutura do DSM 5 está em conformidade com o CID-11 (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

2.1.2 Prevalência

Nos Estados Unidos cerca de uma em cada 59 crianças aos 8 anos de idade em 2014 apresentou o diagnóstico de TEA (BAIO *et al.*, 2018), neste e em outros países foi relatado a frequência de 1% da população (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013) e considerando a população mundial, em 2012, a prevalência descrita de TEA foi de uma em cada 160 crianças (ELSABBAGH *et al.*, 2012).

O número de casos exibiu um crescimento significativo e demonstrou a proporção de quatro meninos para uma menina (BAIO *et al.*, 2018), porém, apresenta muitas variações, e a relação de três meninos para uma menina também foi descrita (LOOMES; HULL; MANDY, 2017). A ocorrência foi similar entre adultos e crianças (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013) e aconteceu em todos os grupos raciais, étnicos e socioeconômicos (DURKIN *et al.*, 2010). Estimativa confiável de prevalência populacional do TEA no Brasil não foi relatada (ELSABBAGH *et al.*, 2012).

2.1.3 Desenvolvimento

O TEA não é degenerativo, é possível a aprendizagem e compensação ao longo da vida. Os sintomas causam prejuízos no funcionamento social e profissional na vida do indivíduo. O diagnóstico inicial ocorre costumeiramente no segundo ano de vida, porém em casos mais severos pode ser reconhecido antes, como também pode ocorrer perda das habilidades sociais e linguísticas entre 12 e 24 meses. Constantemente, os sintomas são mais intensos na primeira infância e nos primeiros anos de vida escolar, ocorre uma melhora com benefícios no desenvolvimento, porém, em alguns casos, na adolescência pode haver agravamento comportamental (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A independência na vida adulta é alcançada por uma minoria, observada nos casos de acometimento mais brando, que mantém capacidade de linguagem e intelectual superiores, sendo capazes de usar estratégias compensatórias e mecanismos de enfrentamento para mascarar dificuldades em público, ficando mais propícios à ansiedade e depressão. O entendimento do acometimento desta

população no envelhecimento não está estabelecido (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Com relação ao comprometimento intelectual no TEA, um estudo avaliou 3.353 crianças em 9 estados dos EUA e classificou 31,4% na faixa de deficiência intelectual com quocientes de inteligência (QI) ≤ 70 , 24,6% na faixa limítrofe (QI: 71-85) e 44,1 % na faixa média ou acima da média (QI >85). A incapacidade intelectual foi significativamente maior no gênero feminino (37%) em comparação ao masculino (30%) (BAIO *et al.*, 2018). Transtornos mentais comórbidos são frequentes, assim como condições médicas ou genéticas conhecidas. O melhor prognóstico é esperado na ausência de deficiência intelectual e comprometimento da linguagem, assim como associação a outros problemas mentais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A intervenção comportamental é eficaz para melhorar comportamento cognitivo e adaptativo (DAWSON *et al.*, 2009) e quanto mais rápido o início da intervenção melhor pode ser o benefício (WALLACE; ROGERS, 2010; LANDA, 2008).

2.1.4 Etiologia

A etiologia do TEA ainda não é estabelecida, evidências direcionam para o envolvimento de fatores genéticos, neurológicos, ambientais e imunes (PARDO; EBERHART, 2007). Em relação ao fator genético foram detectadas variações de 37% a 90% na taxa de concordância entre gêmeos, 15% de associação a uma mutação genética conhecida e sugere-se que o restante dos casos é poligênico com contribuições pequenas de centenas de *loci* genéticos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Estudos genômicos mostram muitos genes associados ao TEA, sugerindo múltiplas causas e subtipos relacionados a genes específicos (O'ROAK *et al.*, 2012). Provavelmente existem alterações moleculares específicas nos subtipos de autismo, e estas podem diferir entre os sexos (CHAHROUR *et al.*, 2016). Nenhuma variante gênica isolada é responsável por mais de 1% da incidência de TEA (HICKS *et al.*, 2016).

Mecanismos epigenéticos que afetam genes do desenvolvimento neurológico podem contribuir para o fenótipo do TEA (HICKS *et al.*, 2016), enfatizando a importância do ambiente na patogênese do autismo (WARD, 2014). Entre os fatores de risco, pode haver contribuição da idade parental avançada, baixo peso ao nascer,

síndrome do álcool fetal, exposição ao ácido valpróico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013) assim como exposição pré-natal ao progestogênio (LI *et al.*, 2018). O sistema imunológico pode ser o elo entre fatores ambientais e genéticos que acometem o neurodesenvolvimento (HU *et al.*, 2018). É sugerido a ocorrência de uma inflamação cerebral localizada e distúrbio autoimune no TEA (LI *et al.*, 2009).

O envolvimento do sistema imunológico materno (ABOU-DONIA *et al.*, 2019), bem como a elevação da Proteína C reativa (PCR) durante a gestação está relacionada com maior risco de TEA (BROWN *et al.*, 2013). Em animais, a ativação imune materna provocada por injeção de imitador viral ácido policitidílico (poli (I: C)), produziu descendentes masculinos com características de TEA (MALKOVA *et al.*, 2012). A soma de eventos médicos como infecções neonatais e no primeiro ano de vida, desregulação infantil (alimentação, anormalidades do sono e choro excessivo) e baixo peso ao nascimento podem ser relevantes para detecção precoce do TEA, reforçando o envolvimento do meio ambiente nos riscos para o neurodesenvolvimento (WILLFORS *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal regula metabólitos que alteram o comportamento em animais com possível contribuição para a fisiopatologia dos distúrbios do neurodesenvolvimento como o TEA (SGRITTA *et al.*, 2019). A disbiose microbiana mediada pelo metabolismo pode também desempenhar um papel causal no desenvolvimento de transtornos mentais (QIAO *et al.*, 2018).

O envolvimento de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, aumento da carga tóxica de metais, desregulação imune complexa, foi sugerido no TEA (MEILIANA; WIJAYA, 2014) assim como a disfunção na resposta inflamatória hematopoiética (XU; LI; ZHONG, 2015).

A menor diversidade bacteriana na microflora oral no TEA foi observada de forma generalizada. Além disso, patógenos como *Haemophilus* na saliva e *Streptococcus* em placa dentária apresentaram maior abundância, enquanto comensais como *Prevotella*, *Deinomonas*, *Actinomyces*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* apresentaram redução da concentração (QIAO *et al.*, 2018). Um estudo não encontrou diferença no índice de cárie entre TEA e grupo controle, apesar de pior higiene bucal no grupo TEA, como também observou concentração reduzida da atividade antioxidante da saliva no TEA (grupo autista - 5,7 µg / ml e grupo controle - 38 µg / ml, $p < 0,001$). (RAI; HEGDE; JOSE, 2012).

2.1.5 Diagnóstico

Atualmente o diagnóstico do TEA não é obtido a partir de determinação biológica, sendo realizado por meio de observações clínicas e avaliações comportamentais (ECKER, 2011). Os critérios descritivos do DSM-5 são considerados o padrão ouro para diagnóstico do TEA (KULAGE; SMALDONE; COHN, 2014).

São considerados cinco critérios diagnósticos para TEA no DSM-5. O primeiro critério, definido por déficits contínuos na comunicação e interação social, apresenta três áreas: déficits na reciprocidade emocional, déficits nos comportamentos não-verbais de comunicação para a interação social e déficits para desenvolver e manter relacionamentos, assim como compreendê-los. É necessário obter características nestas três áreas dentro deste critério (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O segundo critério, definido por padrões restritos e repetitivos de comportamento e interesses específicos, apresenta quatro áreas: uso da fala, de objetos ou movimentos motores de forma repetitiva ou estereotipada; adesão acentuada a rotinas, ou resistência à alterações de rotina, bem como comportamento verbal e não verbal ritualizados; interesses excessivamente restritos; hiper- ou hiporreatividade para percepção sensorial de estímulos do ambiente ou interesse anormal por estímulos senso-perceptivos. Neste segundo critério é necessário obter pontuação em pelo menos duas destas áreas. É necessário especificar a gravidade como nível de apoio tanto para o primeiro quanto para o segundo critério, sendo: Nível-1 exigindo apoio; Nível-2 exigindo apoio substancial; Nível-3 exigindo apoio muito substancial (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Os sintomas necessitam ser observados no início da infância, em história atual ou prévia, como terceiro critério. No quarto critério os sintomas devem ser capazes de gerar danos no funcionamento social, acadêmico e/ou profissional, no presente. E como quinto critério, os sintomas não são mais bem explicados por transtornos do desenvolvimento intelectual ou atraso global do desenvolvimento (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Existe a necessidade de especificar se há ou não comprometimento intelectual, bem como da linguagem, sendo necessário descrever este comprometimento. É exigido o registro de associações a condições médicas (por exemplo: epilepsia, distúrbios do sono e gastrointestinais) ou genéticas conhecidas (por exemplo:

síndrome de Rett, síndrome do X-frágil, síndrome de Down), ou fatores ambientais (por exemplo: baixo peso ao nascer, síndrome do álcool fetal ou exposição fetal ao ácido valpróico). Transtornos do neurodesenvolvimento, mental ou comportamental associados também necessitam ser especificados, assim como a catatonia. Cerca de 70% das pessoas com TEA podem apresentar alguma comorbidade mental e 40% podem apresentar duas ou mais, como exemplo o transtorno do déficit de atenção/hiperatividade, transtorno do desenvolvimento da coordenação, transtornos depressivos e transtorno de ansiedade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Existem instrumentos padronizados de diagnósticos do comportamento, baseados em avaliação clínica, entrevistas com cuidadores, buscando melhorar a confiabilidade do diagnóstico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Instrumentos de rastreamento procuram investigar na população geral, sinais precoces de risco de autismo, sem finalidade de diagnóstico (BARTON; DUMONT-MATHIEU; FEIN, 2012). Na maioria das vezes estes instrumentos são em forma de questionário e possuem os pais ou cuidadores como respondentes, e os instrumentos de diagnóstico são avaliados por especialistas (SEIZE; BORSA, 2017). Alguns dos instrumentos utilizados no Brasil são: Indicadores Clínicos de Risco para o Desenvolvimento Infantil (IRDI) (CAMPANA; LERNER; DAVID, 2015), *Modified Checklist for Autism in Toddlers* (M-CHAT) (LOSAPPIO; PONDÉ, 2008), Escala de Avaliação de Traços Autísticos (ATA) (ASSUMPÇÃO JUNIOR et al., 2008), *Childhood Autism Rating Scale* (CARS) (PEREIRA; RIESGO; WAGNER, 2008) e *Early Screening of Autistic Traits Questionnaire* (ESAT) (DIETZ et al., 2006). Para fins de orientação de equipes multiprofissionais da rede SUS, o Ministério da Saúde lançou as Diretrizes de Atenção à reabilitação da pessoa com TEA e inseriu o M-CHAT como instrumento de rastreamento de indicadores do TEA, adaptado e validado para uso no Brasil, indicado para crianças de 18 a 24 meses e o IRDI como instrumento de rastreamento do desenvolvimento infantil, utilizado entre zero e 18 meses, dividido em quatro faixas etárias (BRASIL, 2014). O IRDI é capaz de detectar sinais precoces de problemas de desenvolvimento em crianças que estão desenvolvendo o TEA, mas não é ferramenta de triagem (CAMPANA; LERNER; DAVID, 2015).

A idade do diagnóstico tem variado entre 1,5 a 6 anos (LANDA, 2008). Nos EUA, a média do primeiro diagnóstico em sete estados foi 44 meses entre as crianças classificadas na faixa de incapacidade intelectual e 59 meses entre as crianças com

QI>70 (BAIO, 2014). No sexo feminino há relatos de maior frequência de deficiência intelectual, porém na ausência desta e do déficit de linguagem o diagnóstico pode ser prejudicado devido a dificuldades sociais e de comunicação mais discretas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Sugere-se que os critérios de diagnósticos para TEA devam ser aperfeiçoados no futuro considerando-se as características distintas de gênero (LOOMES; HULL; MANDY, 2017; HALLADAY *et al.*, 2015).

2.1.6 Possíveis biomarcadores no TEA

Devido à diversidade de espectro é improvável que TEA esteja associado a um único biomarcador, sendo estes provavelmente complexos e relacionados a aspectos da biologia, bem como da genética (ECKER, 2011). Características genética e epigenética podem ser mostrados por biomarcadores moleculares do TEA, sendo promissores aqueles relacionados a função mitocondrial, estresse oxidativo, função imune e aglomerados genéticos (GOLDANI *et al.*, 2014). Muitos genes foram associados ao TEA, mas ainda não foi estabelecido um diagnóstico genético (O'ROAK *et al.*, 2012).

Foram demonstrados níveis elevados de serotonina no sangue (GABRIELE; SACCO; PERSICO, 2014), baixa disponibilidade de receptores de neuropeptídeos (OZTAN, *et al.*, 2018); assim como níveis plasmáticos baixos de melatonina (MELKE *et al.*, 2007) e de ocitocina (HAMMOCK *et al.*, 2012).

Estudos proteômicos e metabolômicos forneceram evidências para identificação de biomarcadores (SCHWARTZ *et al.*, 2010; YAP *et al.*, 2010; EMOND *et al.*, 2013). Na urina foi observado maiores níveis de taurina e menores de glutamato, sugerindo alterações no metabolismo de enxofre e aminoácidos em crianças com TEA (YAP *et al.*, 2010). No tecido cerebral de pacientes com TEA foi observado aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e GM-CSF), citocina (IFN- γ) e interleucina (IL) (IL-8), evidenciando o aumento da resposta imune inata e adaptativa pela via Th1 (LI *et al.*, 2009). As proteínas Apolipoproteína (Apo) B-100, Proteína Relacionada ao Fator H do Complemento (FHR1), Complemento C1q e Fibronectina 1 (FN1) apresentaram diferente expressão no sangue periférico no TEA (CORBETT *et al.*, 2006). Assim como, níveis plasmáticos elevados das citocinas

Eotaxina, TGF- β 1 e TNF- α (HU *et al.*, 2018), e das IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12p4 (ASHWOOD *et al.*, 2011) foram apontados.

Um estudo piloto encontrou níveis aumentados das proteínas ApoA1 e ApoA4 (envolvidas no metabolismo do colesterol) e de Paraoxonase 1 (PON1) no plasma e sugeriu que, em algumas crianças com TEA, o metabolismo do colesterol é desregulado e ocorre aumento do estresse oxidativo (NGOUNOU WETIE *et al.*, 2014). Níveis elevados de autoanticorpos circulantes, da classe imunoglobulina G (IgG), contra 9 proteínas neuronais comumente associadas à degeneração neuronal, justifica a pesquisa de biomarcador de autoanticorpos antineuronais e antigliais na triagem de crianças com TEA (ABOU-DONIA *et al.*, 2019). Foi sugerido o uso de hipermetilação da Apolipoproteína E (ApoE) no DNA do sangue periférico como biomarcador diagnóstico para do TEA (HU *et al.*, 2018).

As seguintes características foram definidas como ideais para biomarcadores moleculares no TEA: coleta da amostra indolor, rápida, não invasiva; possibilidade de ser realizada em casa por familiares, possuir baixo custo, o biomarcador ser produzido pelo cérebro ou estar relacionado com seu funcionamento, ser estável, apresentar diferença da população geral, ser específico e capaz de diferenciar de outros distúrbios de neurodesenvolvimento e ser correlacionado a ferramentas de rastreio (GALIANA-SIMAL *et al.*, 2018). No entanto, ainda não estão disponíveis biomarcadores com estas características para diagnóstico da TEA.

O sangue é um dos materiais mais utilizados para determinar os biomarcadores no TEA (GALIANA-SIMAL *et al.*, 2018), apesar da saliva conter a maioria dos compostos encontrados no sangue (HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007).

2.2 Saliva

A saliva é um fluido aquoso composto por 99% de água e diversos componentes salivares como proteínas, peptídeos, DNA, RNA e eletrólitos, o que a transforma em uma solução viscoelástica com funções importantes como lubrificação, digestão, proteção antimicrobiana e balanceamento do sistema de desmineralização/remineralização dos dentes (CARPENTER, 2013). Além da secreção das glândulas salivares, está presente na saliva constituintes do fluido

crevicular, oriundo do sulco gengival, transudato sérico da mucosa, células epiteliais e imunológicas além de microrganismos (PFAFFE *et al.*, 2011).

Existem três pares de glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e numerosas glândulas menores (MELVIN *et al.*, 2005). As glândulas parótidas estão localizadas nos tecidos subcutâneos da face, sobrejacentes ao ramo mandibular, as sublinguais estão localizadas abaixo da língua, as submandibulares na região inferior da mandíbula e as glândulas menores, que são aproximadamente 600 estão posicionadas na mucosa em quase toda a cavidade oral (PFAFFE *et al.*, 2011).

As glândulas são compostas por células dos ácinos, que compõem a parte secretora, que podem ser serosas ou mucosas, e por células do ducto (MELVIN *et al.*, 2005). As células acinares produzem componentes orgânicos, proteínas e glicoproteínas (APS; MARTENS, 2005), em um fluido isotônico, com concentrações de cloreto de sódio semelhantes ao plasma. Assim que este fluido passa pelo ducto, o cloreto de sódio é reabsorvido, enquanto o potássio e o bicarbonato são secretados. Tanto as células acinares quanto as do ducto produzem proteínas com atividades biológicas relevantes, porém as acinares são responsáveis pela secreção de mais de 80% das proteínas salivares (MELVIN *et al.*, 2005).

Os eletrólitos, componentes inorgânicos da saliva, são transportados do soro para os ácinos e ductos. Na saliva, ocorrem em maiores concentrações o sódio, potássio, cloreto e bicarbonato, enquanto o cálcio, magnésio e fosfato, ocorrem em concentrações menores. Os componentes orgânicos, como as proteínas, podem ser secretados pelas glândulas salivares (APS; MARTENS, 2005), ou entram nas glândulas por meio de transporte ativo, difusão passiva ou ultrafiltração, neste caso, originam da circulação sanguínea (MELVIN *et al.*, 2005). As proteínas lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, cistatinas e histatinas apresentam funções antibacterianas e antifúngicas, as mucinas mostram um papel antiviral, as alfa-amilase, lipase, proteinase, DNase e RNase são importantes para a digestão (APS; MARTENS, 2005).

As glândulas parótidas produzem saliva serosa (aquosa e menos viscosa), as sublinguais secretam saliva predominantemente mucosa (secreção enriquecida de mucinas), as submandibulares secretam saliva mucosa e serosa e as glândulas salivares menores produzem saliva predominantemente mucosa, com exceção da secreção das glândulas de von Ebner (PFAFFE *et al.*, 2011).

A secreção salivar diária dos humanos é de aproximadamente um litro, a maior parte proveniente das glândulas parótidas e submandibulares. Entre as refeições, no período com menor estimulação deste sistema, a saliva é liberada em taxas relativamente lentas e durante o sono a secreção salivar reduz ainda mais. Durante os períodos de atividade mastigatória, 80 a 90% da produção salivar ocorre devido estímulos como o paladar, o olfato e as forças mastigatórias (MELVIN *et al.*, 2005). As glândulas parótidas apresentam maior resposta a dieta, as submandibulares e sublinguais são menos sensíveis a dieta, contribuindo mais para o fluxo salivar em repouso, as glândulas menores não apresentam resposta a dieta, contribuem com 10% do fluxo e são importantes para manter uma camada de mucina junto a mucosa (CARPENTER, 2013).

A estimulação do sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático resulta em produção de saliva, porém com volumes e concentrações distintas. O estímulo do SNA simpático promove uma secreção salivar em volume menor e com maior concentração de proteína e o estímulo do SNA parassimpático promove uma secreção salivar em maior volume, rica em eletrólitos, com baixa viscosidade e com baixa concentração de proteínas (APS; MARTENS, 2005).

2.2.1 Saliva como fluido diagnóstico

Entre os constituintes salivares estão >3000 proteínas, >3000 RNAs mensageiros, pelo menos 50 tipos micro RNAs, > 250 metabólitos, >700 espécies de microrganismos como vírus, fungos e bactérias que são derivados diretamente das glândulas salivares ou provenientes de outra fontes, como o sangue (KACZOR-URBANOWICZ *et al.*, 2016). Na saliva estão presentes mais de 2000 peptídeos, sendo que destes, 400-600 são derivados das glândulas, evidenciando a contribuição de outras fontes, como células epiteliais e fluido crevicular (HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007).

Novas tecnologias de diagnóstico salivar revelaram a capacidade da saliva de representar, com exatidão, tanto o estado fisiológico quanto o patológico (KACZOR-URBANOWICZ *et al.*, 2016). As proteínas salivares são biomoléculas importantes neste processo (PFAFFE *et al.*, 2011), sendo assim, pesquisas proteômicas procuram identificar novas proteínas e peptídeos visando quantificar a atividade biológica em

estados patológicos (ROI *et al.*, 2019), pois as proteínas podem refletir a dinâmica do ambiente e a genética (WOODS *et al.*, 2013).

Os biomarcadores salivares têm elevado potencial diagnóstico, apresentando alta sensibilidade. Técnicas genômicas e proteômicas contribuíram para tornar a saliva um método diagnóstico preciso, para doenças bucais e sistêmicas (ROI *et al.*, 2019). A saliva é considerada uma ferramenta valiosa para triagem e estudos epidemiológicos (KAKARADDI; ATHANI; RAVIKUMAR, 2012), capaz de contribuir em investigação laboratorial diagnóstica de doenças infecciosas, autoimunes, neoplasias, análise hormonal e monitoramento de drogas (LIMA *et al.*, 2010).

Para fins diagnósticos, a saliva inteira e não estimulada é utilizada com maior frequência (MILLER *et al.*, 2010). A saliva inteira é uma mistura composta de secreção de todas as glândulas, do fluido do sulco gengival, assim como células, produtos de inflamação e bactérias. A estimulação, mecânica ou química, da produção da saliva afeta a concentração e a quantidade de seus constituintes (MANDEL, 1990). A saliva não estimulada contém concentrações mais altas de biomarcadores de diagnóstico (MILLER *et al.*, 2010).

A coleta da saliva inteira e não estimulada pode ser obtida quando a pessoa permite a saliva escorrer pelo lábio inferior para dentro do tubo, ou por meio de rolo de algodão, gaze, filtro de papel ou outro material sintético, ou mesmo ser aspirada diretamente do assoalho bucal (MANDEL, 1990).

A saliva pode ser analisada por vários métodos, entre eles estão o imunoensaio, ensaio enzimático colorimétrico, ensaio cinético, cromatográfico e espectroscopia de massa. Todos estes métodos necessitam de reagentes que podem alcançar custos elevados (KHAUSTOVA *et al.*, 2010).

A ATR-FTIR é utilizada para análise da saliva e apresenta vantagens como ausência de reagentes, tempo reduzido de análise, necessidade de quantidade mínima de amostra (KHAUSTOVA *et al.*, 2010; KHAUSTOVA *et al.*, 2009).

2.3 Possíveis biomarcadores salivares no TEA

No TEA dificuldades comportamentais podem tornar mais complexa a coleta de sangue e urina, entretanto, a saliva é adequada para identificar biomarcadores importantes (RATAJCZAK; SOTHERN, 2015) e sua coleta indolor, não invasiva

contribui para que seja considerada um instrumento relevante para diagnóstico (WORMWOOD *et al.*, 2015) (MORTHA *et al.*, 2018) transformando-a em uma amostra biológica apropriada para estudo de biomarcadores no TEA (GALIANA-SIMAL *et al.*, 2018). Além de ser confiável para diagnóstico, a saliva oferece menor estresse à pessoa com TEA, tem menor risco de contaminação para o profissional que a manuseia, pode ser coletada em casa (HOFMAN, 2001), por pessoas com pouco treinamento (KAKARADDI; ATHANI; RAVIKUMAR, 2012) pois, apresenta facilidade de coleta e está prontamente disponível (LIMA *et al.*, 2010).

Biomarcadores do Sistema Nervoso Central (SNC), podem ser explorados por meio da proteômica salivar (WORMWOOD *et al.*, 2015). Um estudo propõe que biomarcadores ideais deveriam ser expressos no cérebro, serem fisiologicamente ou funcionalmente relevantes para o neurodesenvolvimento, além de facilmente medidos a partir de amostras periféricas, e diferencialmente expressos em indivíduos com TEA. Este mesmo estudo, dentro destes critérios, identificou, na saliva do TEA, um conjunto de 14 miRNAs, mostrando especificidade para diagnóstico de quase o dobro do M-CHAT-R, o padrão ouro atual usado na triagem de TEA, sugerindo a possibilidade de rastreio de biomarcadores miRNA para o diagnóstico de TEA (HICKS *et al.* 2016). O microRNA salivar foi capaz de discriminar com precisão crianças com TEA (HICKS *et al.* 2018), 4 microRNAs foram capazes de diferenciarem TEA de não TEA, além disto, a alteração nos microRNAs salivares em crianças com TEA, foram associados a níveis de comportamentos, sendo que, 8 microRNAs estavam associados a afeto social e 10 microRNAs, a comportamento restrito / repetitivo (HICKS *et al.* 2020).

Um estudo que extraiu DNA da saliva observou que o aumento do número de alelos La do 5HTTLPR, região promotora do gene transportador de serotonina, está relacionado a um aumento do comportamento autolesivo no TEA (KOLEVZON *et al.*, 2014).

Características distintas da microbiota intestinal e salivar de pessoas com TEA e seus parentes de primeiro grau (pais e irmãos) foram identificadas utilizando tecnologia de sequenciamento de genes 16SrRNA (RNA ribossomal) (KONG *et al.*, 2019).

Diferenças no nível de várias proteínas salivares no TEA em relação ao controle, incluindo proteína induzível por prolactina, lactotransferrina, região C da cadeia de imunoglobulinas (Ig), elastase de neutrófilos, receptor de Ig polimérica, foram encontradas em um estudo piloto, propondo a presença de proteínas

desreguladas e apoiando o conceito de distúrbios do sistema imunológico e gastrointestinal (NGOUNOU WETIE *et al.*, 2015).

Redução no nível de fosforilação da estaterina, histatina1 e proteínas ácidas ricas em prolina (PRPs ácida) foi identificada em crianças com TEA indicando hipofosforilação em pelo menos um destes peptídeo em 66% do grupo com TEA. A caseína de Golgi quinase está envolvida na fosforilação de peptídeos salivares, e é comum a outros órgãos, incluindo o SNC, sugerindo que pode ter ocorrido variações de fosforilação de outras proteínas secretoras relevantes no SNC durante o desenvolvimento embrionário ou na primeira infância (CASTAGNOLA *et al.*, 2008). O biomarcador peroxidativo lipídico 15-F2t-IsoP, presente no estresse oxidativo, foi encontrado em níveis elevados na saliva de crianças com TEA (KARAMOUZI *et al.*, 2007). Redução da concentração de cortisol no período noturno na saliva de adultos com TEA sugere desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (BAKER *et al.*, 2019).

Com intenção de melhor especificidade e precisão diagnóstica a combinação de painéis de biomarcadores salivares avaliados por ferramentas de inteligência artificial podem ser poderosas ferramentas de triagem e diagnóstico (PFAFFE *et al.*, 2011).

2.4 FTIR

A espectroscopia de infravermelho (IV) baseia-se nas vibrações dos átomos. A radiação infravermelha provoca vibrações dos átomos das moléculas, ocorre uma mudança do dipolo elétrico durante esta vibração resultando na absorção do IV. De acordo com o átomo envolvido e a sua força de interação entre as moléculas, ocorre a absorção de um determinado comprimento de onda. A espectroscopia de IV mensura quantitativamente esses modos vibracionais e os relacionam à composição química, ou seja, representa a impressão digital da amostra através das frequências de vibrações entre as ligações dos átomos presentes nela, sendo capaz de identificar materiais. O espectro da região IV é dividido em três partes: região do IV próximo de 13000 a 4000 cm^{-1} , a região do IV médio de 4000 a 400 cm^{-1} e região do IV distante aproximadamente de 400 a 10 cm^{-1} . A região do IV médio é o espectro mais

informativo para amostras biológicas, pois contém muitas absorções correspondentes às vibrações fundamentais das espécies moleculares (STUART, 2005).

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica vibracional, que se refere ao estudo da absorção de ondas eletromagnéticas na região média (4000–400 cm^{-1}) (ANDREW CHAN; KAZARIAN, 2016), fornecendo informações qualitativas e quantitativas em análise de multicomponentes, sem destruí-los (BRUYNE; SPEECKAERT; DELANGHE, 2018), sendo eficaz para amostras biológicas, podendo refletir o seu estado de saúde (BAKER *et al.*, 2014). A FTIR tem aplicação em diagnóstico e monitoramento de câncer e outras doenças por análise de fluidos corporais, células e tecidos; classificação de microrganismos; análise de cálculos renais; unhas (BRUYNE; SPEECKAERT; DELANGHE, 2018).

A ATR-FTIR é uma ferramenta que analisa os componentes salivares com precisão, em pouco tempo, apresenta ainda a capacidade de reprodutibilidade, não necessita reagentes ou preparação especial da amostra, fácil de utilizar e com sensibilidade comparável aos métodos bioquímicos clássicos de análise, não invasiva, sendo necessário volume mínimo de amostra (KHAUSTOVA *et al.*, 2010; KHAUSTOVA *et al.*, 2009).

Estudos realizados com FTIR utilizando plasma e soro mostraram sua capacidade diagnóstica para câncer de ovário (GAJJAR *et al.*, 2013), doenças cardíacas (HASS *et al.*, 2010), gliomas (HANDS *et al.*, 2013) e utilizando a saliva foi capaz de diagnosticar doença periodontal (FUJII *et al.*, 2016), diferenciar a composição salivar de fumante e não fumante (RODRIGUES *et al.*, 2017), comprovar alterações salivares em indivíduos com síndrome de ardência bucal (RODRIGUES *et al.*, 2019), fazer análise quantitativa de biomarcadores de estresse (CAETANO JÚNIOR; STRIXINO; RANIERO, 2015).

Estudos realizados utilizando o ATR-FTIR, pelo grupo de pesquisa ao qual pertencem autores deste estudo, identificaram o potencial da saliva como fluido diagnóstico da doença renal crônica, do câncer de mama e diabetes (RODRIGUES R *et al.*, 2019, CAIXETA *et al.*, 2020, FERREIRA *et al.* 2020).

O presente estudo buscou obter um diagnóstico preciso com determinação biológica do TEA por meio da saliva utilizando ATR-FTIR. A determinação biológica pode contribuir para redução do tempo de diagnóstico, uma vez que auxilia o médico especialista na tomada de decisão e favorece o início da terapia indicada e diminuição de incapacidades. A ATR-FTIR é utilizada no diagnóstico de várias doenças, no

entanto, sua aplicação no TEA permanece desconhecida. A técnica utilizada uniu as vantagens da saliva, como fluido diagnóstico, associadas aos benefícios da ATR-FTIR. A saliva apresenta coleta não-invasiva e indolor, assim como, menor risco de contaminação ou possibilidade de gerar estresse. A ATR-FTIR não utiliza reagentes, é uma tecnologia sustentável, apresenta baixo custo de análise, é altamente reproduzível e rápida, além de utilizar pequena quantidade de amostra. Por conseguinte, as vantagens apresentadas pela técnica viabilizam sua aplicação no diagnóstico do TEA tanto no sistema público de saúde quanto no privado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar biomarcadores salivares com finalidade de diagnóstico biológico no TEA por meio da plataforma ATR-FTIR.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer assinaturas espectrais salivares para diagnóstico do TEA utilizando ATR-FTIR.
- Construir plataformas salivares diagnósticas por meio de ATR-FTIR.

4 ARTIGO - A sustainable and non-invasive salivary ATR-FTIR platform for complementary diagnostics of autism spectrum disorder

A sustainable and non-invasive salivary ATR-FTIR platform for complementary diagnostics of autism spectrum disorder

SILVA, S.F.P.¹, CARDOSO-SOUSA, L.¹, CAIXETA, D.C.^{1,2}, LADICO, F., MARQUES, K.L.S., CUNHA, T.C.A.³; CUNHA, T.M.³; GOULART, L.R.^{2,4}, CASTRO, O.W.⁶, GALLON L.M.⁷, SIQUEIRA W.L.⁷, SABINO-SILVA, R.^{1,7*}

¹ Integrative Physiology and Salivary Nanobiotechnology Group; Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

² School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³ Department of Pulmonology, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California Davis, California, USA.

⁵ Institute of Biological Sciences and Health, Federal University of Alagoas (UFAL), Maceio, Alagoas, Brazil

⁶ Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil.

⁷ College of Dentistry, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

***Corresponding Author:**

Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuruama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil. Phone: +55 34 3218 2100
E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract

Diagnosis of autism spectrum disorder (ASD) is often done when a child is about 36-month-old, and it is preceded by an extended and stressful period until the ASD diagnosis is confirmed. Currently, there is a lack of ASD biologically-based diagnosis methods, making the development of precise and suitable diagnosis tools for ASD a remaining challenge. Therefore, the search for a cost-effective, non-invasive, sustainable (reagent-free) and accurate ASD diagnostic platform is a must to improve outcomes in ASD subjects. Attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy has been used in the diagnosis of several diseases, however, its application to ASD remains unknown. Here, ultra-low volume of saliva samples from 19 ASD subjects (a medication-free population) and 34 neurotypical (NT) were analyzed using an ATR-FTIR platform, followed by univariate analysis coupled with receiver operating characteristic (ROC) curve to calculate the performance of pre-validated spectral biomarkers. We demonstrated that three salivary vibrational modes of ASD subjects were highly distinct ($p < 0.05$) from those of NT. These vibrational modes were pre-validated as potential diagnostic spectral biomarkers by ROC curve analysis. Compared to the NT, an accuracy of 76.5% was achieved using the band at 2942-2895 cm^{-1} . The novel spectral salivary biomarkers using univariate analysis here reported may support a robust alternative for ASD diagnostic using an ultra-low volume, non-invasive and green technology platform.

Keywords Autism spectrum disorder (ASD) · Attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy · Diagnosis · Saliva · Biomarkers

Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) are divergent neurodevelopmental disorders frequently characterized by impairments in interaction and social communication, as well as restricted interests and repetitive behaviors [1, 2]. ASD can change the quality of life of affected subjects and their families and increased financial burden for them and for the society [3]. It is estimated that 1 in 160 children worldwide has ASD [4]. Although the fifth edition of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) is the gold standard for ASD diagnosis, there are strong limitations to properly diagnose ASD, especially by the use of biofluids as blood, urine and saliva, since DSM-5 is based in descriptive criteria without laboratorial tests [5]. Thus, developing precise and reliable diagnosis tools for ASD remains a challenge. Besides, another restraint in ASD diagnosis is to identify high accuracy biomarkers to detect this disorder [6]. It is important to point out that early interventions are very effective to improve outcomes in toddlers with autism [6].

Saliva can resound the physiological state in humans, and it has been accepted that salivary biomarkers can be used to early detect and to monitor systemic diseases [7,8]. The non-invasive, easily collected, and favorable storage and transportation of saliva are among the advantages of its use as biofluid [9]. Considering the characteristics of ASD children, it is important emphasizes that saliva can provide a less stress collection [9]. Apart from the watery content of saliva, this biofluid contains other biomolecules like proteins, peptides, carbohydrates, lipids, deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA) that can be used as sources for real-time diagnosis of systemic diseases [10]. There is a strong limitation of biomarkers to ASD diagnosis in biofluids. Furthermore, it was showed that phosphorylation level of salivary phospho-peptides (derived from statherin, histatin 1 and acidic proline-rich proteins) were lower in ASD children [11]. Besides, ASD patients shown to have dysbiosis in the oral microbial community, suggesting that a potential diagnostic approach may be based on oral microbial features [12]. The mass spectrometry (MS) based proteomics platform suggest that peptide analysis can be a useful methodology for selection of salivary peptide markers [13]. The expression levels of the neuropeptide receptor based on mass spectrometry (MS) proteomics platform in blood have been also proposed as a biomarker of ASD, since total neuropeptide receptor gene expression was lower in ASD children than in healthy controls. Although the gene expression of the neuropeptide receptor may represent a promising blood biomarker for ASD, future studies should evaluate in a medication-free population [3]. Currently, the biofluids-based tests present important limitations to be inserted in gold standard for ASD diagnosis. Often, the performed ASD tests do not provide high accuracy although it uses expensive cutting-edge methods. Therefore, new alternatives of salivary monitoring should be studied.

Attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy is a label-free, sustainable, fastly, high sensitive, non-destructive and highly reproducible physicochemical analytical platform that is capable to discriminate unique molecular fingerprint of each sample without sample preparation. Thus, ATR-FTIR spectroscopy has therefore irrefutable potential to be applied in diagnostic devices. Infrared (IR) spectroscopy is robust, qualitative and quantitative platform for monitoring characterization of biological molecules in fluids [14,15]. Considering that a biomolecule is determined by its unique structure, each one will exhibit a unique ATR-FTIR signature, representing the vibrational modes of the constituent structural bonds. ATR-FTIR has been also considered a green technology due to method that exclude the use of hazardous materials [16].

To our knowledge, the potential of salivary diagnostic for ASD by ATR-FTIR spectroscopy was never been evaluated.

In the present study, we tested the hypothesis that non-invasive spectral markers can be differentially expressed in ultra-low volumes of saliva in ASD subjects to be employed as salivary biomarkers for ASD complementary diagnosis. Thus, the aim of present study was to establish specific salivary infrared spectral signatures that are reliable to diagnose ASD subjects.

Results

Characterization of ASD

A total of 53 ASD and NT subjects were prospectively included to pursue the goal of developing a reliable spectral biomarker for ASD and to demonstrate the utility of our platform for non-invasive complementary diagnostics of ASD. The demographic and clinical characteristics of all participants are depicted in **Table 1**.

Table 1. Demography characteristics of ASD subjects and matched NT subjects.

Characteristics	NT n=34	TEA n=19
Age (years)		
Range	3 – 15	2 – 16
Average \pm SD*	8.44 \pm 3.13	7.84 \pm 4.18
Gender		
Male	61%	73%
Race		
Black	2.9%	10.5%
Pardo	20.6%	15.8%
White	76.5%	73.7%
Weight in birth (grams)		
Range	1400 – 3950	800 – 4135
Average \pm SD	3079 \pm 613.7	3188 \pm 749.1
Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (%)	0%	26.31%

*standard deviation

As expected, NT subjects showed age-, gender-, and race-matched to ASD subjects. Both groups included males and female subjects. ASD and NT subjects showed similar age (NT 8.44 \pm 3.13years old; range 3 to 15 years old and ASD 7.84 \pm 4.18 years old; range 2 to 16 years old). Five ASD subjects (26.31%) presents attention deficit hyperactivity disorder and, as expected, it characteristic do not occur in NT subjects.

Average spectra of saliva

A representative infrared average spectrum of saliva from ASD and NT subjects, which contains changes in the expression of some molecules are represented in **Fig. 1A**. These salivary spectra indicated specific differences among NT and ASD subjects. Three vibrational modes of interest 2935 cm^{-1} (2942-2895 cm^{-1}), 1636

cm^{-1} (1738-1581 cm^{-1}) and 986 cm^{-1} (1005-959 cm^{-1}) are prominently displayed on in **Fig. 1B, 1C and 1D**, respectively. The assignments of main wavenumbers evaluated in this manuscript are described in **Table 2**.

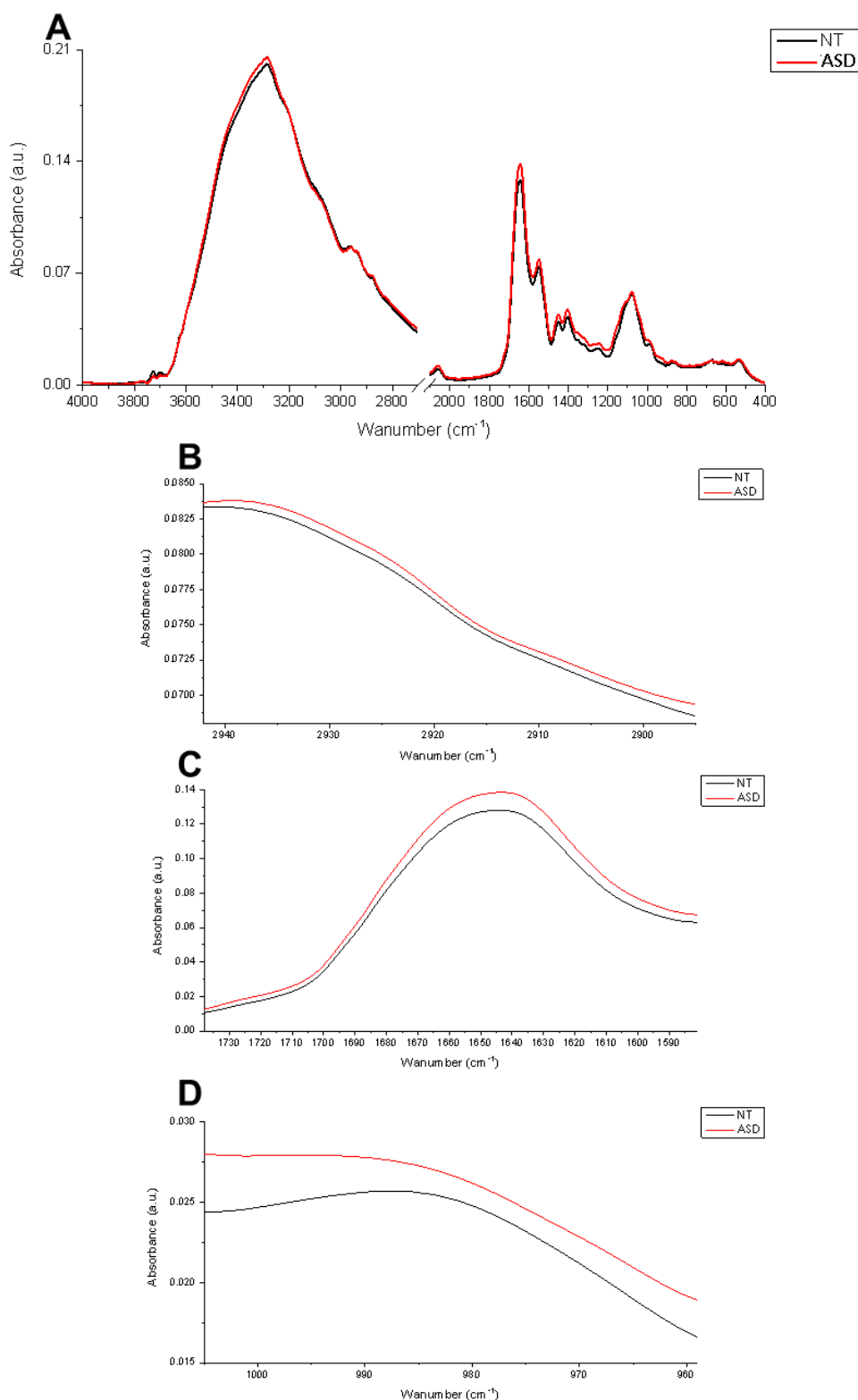


Fig. 1 Average ATR-FTIR spectra (4000-400 cm^{-1}) in saliva of Neurotypical (NT) and autism spectrum disorder (ASD) subjects. **A.** Spectra between 4000-400 cm^{-1} . **B.** 2935 cm^{-1} (2942-2895 cm^{-1}), **C.** 1636 cm^{-1} (1738-1581 cm^{-1}) and **D.** 986 cm^{-1} (1005-959 cm^{-1}).

Table 2. Assignments of main wavenumbers of saliva ATR-FTIR spectra. Assignments based on different references [17-20]. Abbreviations: ν = stretching vibrations, δ = bending vibrations, s= symmetric vibrations and as = asymmetric vibrations.

Peak (cm ⁻¹)	Proposed vibrational mode	Molecular source
2960 (2981-2943)	ν as CH ₃	Lipids and DNA
2935 (2942-2895)	Stretching as vibration of CH ₂	Acyl chains of Lipids
2880 (2889-2860)	Stretching C-H	Lipids
2060 (2093-2023)	Second order band	Inespecific
1636 (1738-1581)	β -sheet structure of amide I	Protein
1549 (1571-1493)	Amide II [ν (N-H), ν (C-N)]	Protein
1447 (1483-1429)	δ as (CH ₃)	Protein (methyl groups)
1404 (1426-1362)	COO- symmetric stretching	Lipid /Protein
1244 (1271-1217)	PO ₂ ⁻ asymmetric	(phosphate I)
1045 (1191-1006)	C-O stretching, C-O bending of the C-OH groups [ν (C-O), δ (C-O)]	Carbohydrates (glycogen glucose, fructose)
986 (1005-959)	C-O ribose and vs of DNA	Ribose and DNA

Spectral bands analyzed by IR spectroscopy

Spectral band areas that indicate the expression of specific molecules were analyzed in saliva. Considering the similar expression of each molecule, the band area values of 8 components are presented in supplementary file (**Supplementary Fig. 1**). Herein, we showed three bands (2935 cm⁻¹ (2942-2895 cm⁻¹), 1636 cm⁻¹ (1738-1581 cm⁻¹) and 986 cm⁻¹ (1005-959 cm⁻¹)) with a potential for ASD diagnostic (**Fig.2**). Representative quantification spectra of 2935 cm⁻¹ (2942-2895 cm⁻¹), 1636 cm⁻¹ (1738-1581 cm⁻¹) and 986 cm⁻¹ (1005-959 cm⁻¹) bands are depicted in **Fig. 2A, 2C and 2E**, respectively. The expression of the spectral mode at 2935 cm⁻¹ (2942-2895 cm⁻¹) was reduced ($p < 0.05$) in ASD than NT subjects. On the other hand, the expression of spectral mode at 1636 cm⁻¹ (1738-1581 cm⁻¹) was increased ($p < 0.05$) in ASD than NT subjects. Besides, the expression of 986 cm⁻¹ (1005-959 cm⁻¹) vibrational mode was also reduced ($p < 0.05$) in ASD than NT subjects.

Considering that sensitivity and specificity are basic characteristics to determine the accuracy of diagnostic and monitoring test, ROC curve analysis were used to evaluate the potential diagnostic of these three spectral bands to distinguish ASD and NT subjects. The cutoff value to 2935 cm⁻¹ (2942-2895 cm⁻¹) band was 0.0275, and the corresponding sensitivity and specificity were 73.68% and 79.41%, respectively. In ROC analysis, the area under the curve (AUC) of this band was 0.709 ($p: 0.012$; **Fig. 2B**). The cutoff value to 1636 cm⁻¹ (1738-1581 cm⁻¹) band was 6.069, and the corresponding sensitivity and specificity were 68.42% and 73.53%, respectively. In ROC analysis, the AUC of this band was 0.7461 ($p:0.0032$; **Fig. 2D**). The cutoff value to 986 cm⁻¹ (1005-959 cm⁻¹) band was 0.063, and the corresponding sensitivity and specificity were 50% and 73.68%, respectively. In ROC analysis, the AUC of this band was 0.6641 ($p:0.0493$; **Fig. 2F**). The mean of second-derivative analysis were similar in both ASD and NT subjects (**Supplementary Fig. 2**).

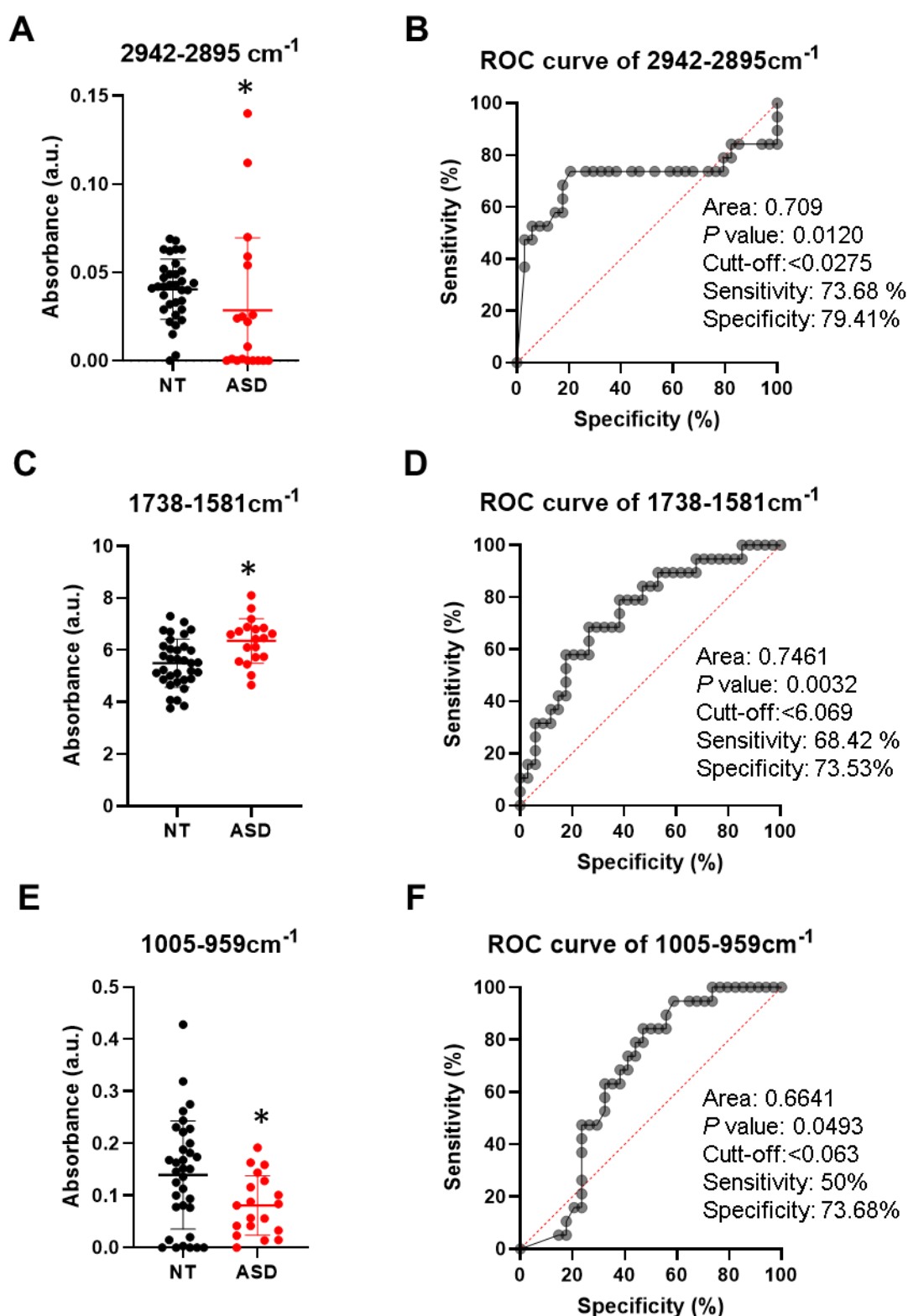


Fig. 2 **A.** band area of 2935 cm^{-1} (2942-2895 cm^{-1}); **B.** ROC curve analyses of 2935 cm^{-1} (2942-2895 cm^{-1}) to neurotypical (NT) and autism spectrum disorder subjects (ASD); **C.** band area of 1636 cm^{-1} (1738-1581 cm^{-1}); **D.** ROC curve analyses of 1636 cm^{-1} (1738-1581 cm^{-1}) to NT and ASD subjects; **E.** band area of 986 cm^{-1} (1005-959 cm^{-1}); **F.** ROC curve analyses of 986 cm^{-1} (1005-959 cm^{-1}) to NT and ASD subjects. * $p < 0.05$ vs NT.

Discussion

The alternative development of a novel, noninvasive and green technology tool for ASD diagnosis based on the expression of specific spectral salivary molecules using ultra-low volumes of saliva are of high importance. Here, we suggested three innovative potential spectral bands showed suitable sensibility and specificity to differentiate ASD than NT conditions, indicating potential diagnostic applicability for ASD. The accuracy of 2935 cm^{-1} (2942-2895 cm^{-1}), 1636 cm^{-1} (1738-1581 cm^{-1}) and 986 cm^{-1} (1005-959 cm^{-1}) band areas are strong candidates for ASD diagnosis using spectral salivary biomarkers. We believe that the use of our salivary protocol in this rapid and inexpensive approach for the early diagnosis of ASD has an untapped potential to facilitate the diagnosis and make powerful impacts on patient quality of life, while also saving costs in public and private health services [15,21]. Analysis of biofluids using ATR-FTIR spectroscopy is a cutting-edge platform advancing towards the clinic, aiming to close a gap as a diagnostic platform to contribute with physician decisions [15].

As expected in ASD state, around 25% of subjects also presents attention deficit hyperactivity disorder compared to very low levels in NT subjects. The frequent co-occurrence of autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms may reflect common neural mechanisms for both conditions [22]. As expected, some ASD subjects evaluated here also develop both conditions. The male-to-female ratio described in the present sample corroborate with other studies [23,24].

Recently we have expanding the diagnostic and monitoring application of salivary ATR-FTIR platform as a discriminatory method to systemic diseases as chronic kidney disease, breast cancer and diabetes [25-26,27]. It is related with some characteristics of ATR-FTIR spectroscopy: high-throughput, label-free and cost effective analytical method [14-15, 28]. The method to dried ultra-low volume of saliva described here may be used in rodent and others human models. Spectral parameters, such as shifts in bands positions and changes in spectral modes intensity can be used to obtain valuable information about sample composition, which may provide diagnostic capacity for several diseases [29]. In present study we do not detected shift in the vibrational modes position.

We analyzed these three pre-validated spectral biomarkers by building the ROC curve and determine their performance to evaluate the diagnostic application. Using the analysis of bands in original data, the biomarker panel could reach AUC value of 0.709 with 73.68% sensitivity and 79.41% specificity. The results demonstrated that it is very promising to set up an ATR-FTIR salivary test for the detection of ASD using these infrared spectral biomarkers. Therefore, a reduction in the band area of 2935 cm^{-1} (2942-2895 cm^{-1}) for stretching as vibration of CH₂ of lipids indicate reduction in some salivary lipids. The literature about fatty acids and lipids related in oral health is very limited. It was showed that occur an increase in the salivary levels of lipid peroxidation in ASD children, however, the levels of lipids were not described [30]. Besides, ASD subjects frequently present deficiencies in specific fatty acids [28], which can be related with reduction of CH₂ of lipids. Considering that dietary intervention strategies have been recommended to ASD subjects [31] and there was a significative correlation between serum and salivary total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein-cholesterol and very low-density lipoprotein-cholesterol [32], it spectral component can be also tested to be used as a lipid nutritional indicator. The present results also indicate that lipidomic analysis in ASD can be valuable to a comprehensive understanding about salivary lipidic biomarkers.

The significant accuracy with spectral biomarker at 1636 cm^{-1} (1738-1581 cm^{-1}) using ROC curve is representative of β -sheet structure on amide I of proteins. The increase in this parameter can be related with higher

expression of several proteins in ASD subjects, as lactotransferrin, prolactin inducible protein, annexin A1, neutrophil defensin, and lipocalin 1 [13]. The differential expression of 986 cm^{-1} ($1005\text{-}959\text{ cm}^{-1}$) indicates reduction of DNA in ASD subjects. The changes in DNA were detected in a previous study that showed specific CNV/gene mutation-specific DNA methylation signatures [33]. However, it is important to emphasize that ATR-FTIR is able to reveal the expression of functional group expressed in several components, which leads the analysis focus in the vibrational modes and not in determination of unique protein, lipid or glycan.

Although the present data reinforces that ATR-FTIR platforms are profitable for spectral biomarkers identification for neurological disease diagnosis using saliva, this is an innovative exploratory study using ATR-FTIR technology for this purpose in ASD. Our findings should be interpreted in light of some limitations. First, although we assessed both models with autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms, we did not test their interactions (hybrid analyses) due to dimensions requires larger samples to capture optimal distributions of both traits within each group. Despite the moderate sample size, further studies with higher sample size are required to validate the clinical applicability of salivary infrared biomarkers to ASD diagnosis. We believe this is an innovative non-invasive salivary approach with strong potential to open a new avenue to the clinical translatability of these infrared spectral biomarkers.

In conclusion, we showed that ATR-FTIR spectroscopy in saliva is suitable to distinguish ASD subjects from NT subjects. Our data suggest specific fingerprint regions (highlighted the salivary spectral modes at 2935 cm^{-1} ($2942\text{-}2895\text{ cm}^{-1}$), 1636 cm^{-1} ($1738\text{-}1581\text{ cm}^{-1}$) and 986 cm^{-1} ($1005\text{-}959\text{ cm}^{-1}$)) are able of discriminate ASD and NT samples based in univariate analysis with only $1\mu\text{L}$. In summary, these salivary results indicate that ATR-FTIR spectroscopy coupled with univariate analysis may support a robust alternative for ASD diagnostic assisting medical decision which allows an earlier intervention.

Methods

Subjects and sample

All the ASD subjects included in this study had previously been diagnosed by DSM-5 protocol performed by specialist doctor. This study had only medication-free subjects. Exclusion criteria for NT and ASD groups included active upper respiratory infection, chronic diseases or syndromes. These experiments were approved by Institutional Ethics Committee of the Federal University of Uberlandia approved the study (IRB Number:10973519.0.0000.5152), and written consent was obtained before any testing or analysis began. The methods were carried out in accordance with the approved guidelines. ASD and NT samples were handled exactly the same in all preprocessing steps.

In total, 19 ASD subjects and 34 NT subjects were recruited for this study. Saliva samples were collected under a protocol approved by institutional committee of UFU. Saliva samples were collected using slight suction through a soft plastic catheter between 10am to 2pm. No intentional stimulation was used, although the presence of the soft plastic catheter might have slightly stimulated the salivary flow. Saliva was collected for two minutes to minimize a possible stress effect. During the saliva collection period, the subjects remained comfortably seated in the presence of the responsible in a well-ventilated and well-lit room. Immediately after saliva collection, samples were stored at -80°C until the analysis. Participants were requested abstain to feed 1 h before the saliva collection [26].

Chemical profile of unstimulated saliva by ATR-FTIR Spectroscopy

The ATR-FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) combined to a micro-attenuated total reflectance (ATR) approach allowed to record spectral signature at 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} region. The ATR unit is composed by a high refractive diamond disc as internal-reflection element. The salivary pellicle with lower reflective index is inserted directly onto the diamond disc. The infrared light is reflected at the interface toward the saliva sample in the diamond-disc, resulting in a specific signature profile waves. All ASD and NT samples (1 μL) were dried using airflow on ATR-crystal for 2 min before salivary spectra recorded in triplicate. The air spectrum was considered as a background in all ATR-FTIR sample analysis. Salivary pellicle spectra and background were captured with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans [15,26].

Spectra data evaluation procedures

The data of spectra data obtained were processed using Opus 6.5 software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). To avoid failures during the salivary sample spectra analysis, each spectrum was normalized by vector and baseline corrected prior to generation of mean spectra and band areas. The band positions were measured using the frequency corresponding to the center of weight of each band. Sensitivity and specificity values were calculated based on the external test set as follows: true negative rate is determined as the percentage of control subjects who are correctly identified as being NT subjects and the true positive rate is determined as the percentage of subjects who are correctly identified as ASD subjects [27]. The second derivative spectra were acquired with the Savitzky-Golay algorithm application using a polynomial order 5 and 20 points of the window. The spectral second derivative normalization was performed by mean and the valley heights indicated the intensity of each salivary component.

Statistical analysis

The data of the band area were analyzed using Student t-test. For all spectral band candidates, we constructed the ROC curve and computed the AUC value, sensitivity and specificity by numerical integration of the ROC curve. The Kolmogorov-Smirnov test was applied to test the normality of the variables. All these analyses were performed using the software GraphPad Prism (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Only values of $p < 0.05$ were considered significant and the results were expressed as mean \pm S.D.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from CAPES/CNPq (#458143/2014), FAPEMIG (#APQ-02872-16), Federal University of Uberlandia and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0). Sabino-Silva, R received a fellowship from PrInt CAPES/UFU. We would like to thank our collaborators at the Dental Research Center in Biomechanics, Biomaterials and Cell Biology (CPbio).

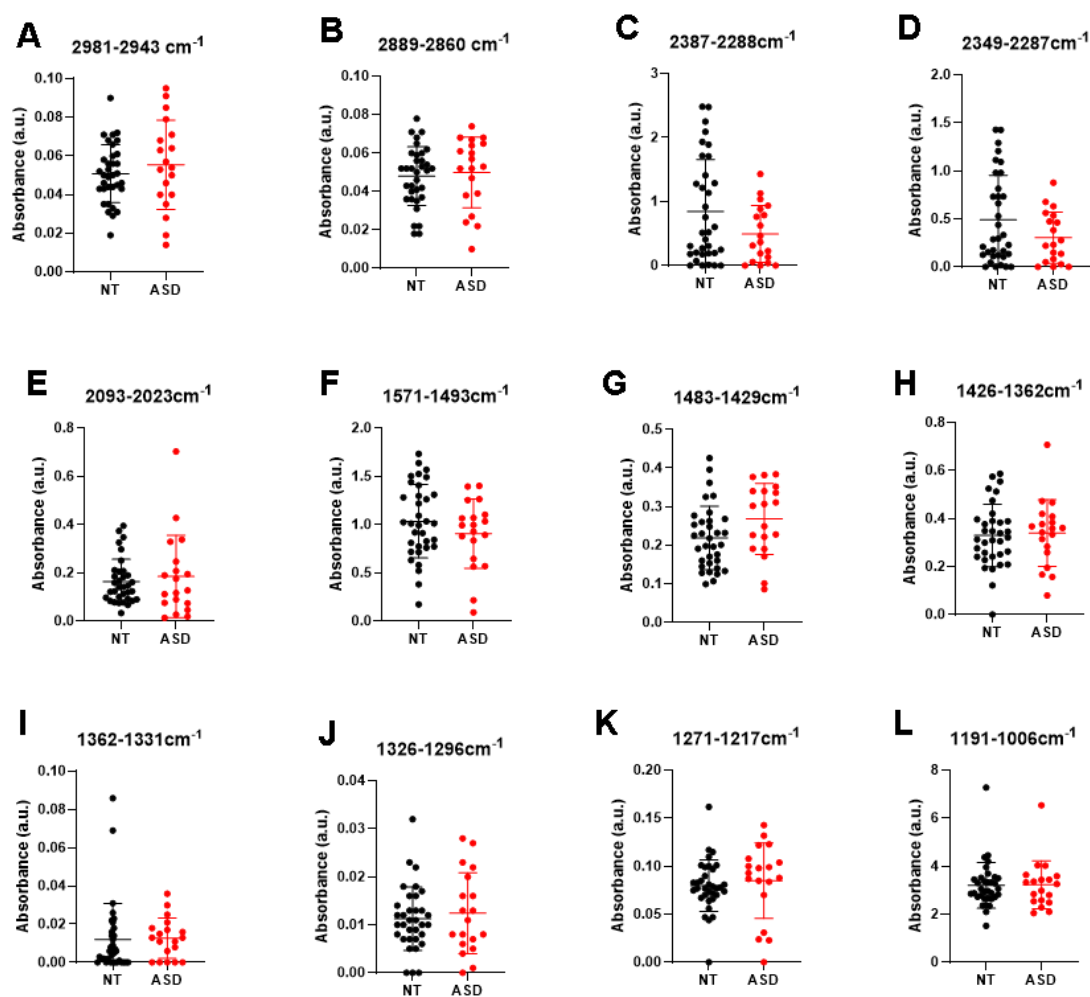
References

- 1- American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®), 5th edn. American Psychiatric Pub, Arlington.
- 2- Landa RJ (2008) Diagnosis of autism spectrum disorders in the first 3 years of life. *Nat Clin Pract Neurol* 4(3):138-147. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0731>
- 3- Oztan O, Jackson LP, Libove RA, Sumiyoshi RD, Phillips JM, Garner JP, Hardan AY, Parker KJ (2018) Biomarker discovery for disease status and symptom severity in children with autism. *Psychoneuroendocrinology* 89:39-45. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.12.022>
- 4- Elashbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcin C, Montil-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C, Yasamy MT, Fombonne E (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res*, 5(3), 160-79.<http://dx.doi.org/10.1002/aur.239>
- 5- Kulage KM, Smaldone AM, Cohn EG (2014) How will DSM-5 affect autism diagnosis? A systematic literature review and meta-analysis. *J Autism Dev Disord* 44(8):1918–1932. <https://doi.org/10.1007/s10803-014-2065-2>
- 6- Christensen DL, Baio J, Van Naarden Braun K, Bilder D, Charles J, Constantino JN, Daniels J, Durkin MS, Fitzgerald RT, Kurzius-Spencer M, Lee LC, Pettygrove S, Robinson C, Schulz E, Wells C, Wingate MS, Zahorodny W, Yeargin-Allsopp M (2016) Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Surveill Summ* 65(3):1-23. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.ss6503a1>
- 7- Hu S, Loo JA, Wong DT (2007) Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 4(4):531-538. <https://doi.org/10.1586/14789450.4.4.531>
- 8- Thomadaki K, Helmerhorst EJ, Tian N, Sun X, Siqueira WL, Walt DR, Oppenheim FG (2011) Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics. *J Dent Res* 90(11):1325-1330. <https://doi.org/10.1177/0022034511420721>
- 9- Hofman LF (2001) Human saliva as a diagnostic specimen. *The Journal of nutrition* 131(5):1621S-1625S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1621S>
- 10- Malamud D, Rodriguez-Chavez RI (2011) Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am* 55(1):159–178. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.004>
- 11- Castagnola M, Messana I, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Morelli A, Pecoraro AM, Neri G, Torrioli MG, Gurrieri F (2008) Hypo-phosphorylation of salivary peptidome as a clue to the molecular pathogenesis of autism spectrum disorders. *J. Proteome Res* 7(12):5327-5332. <https://doi.org/10.1021/pr8004088>
- 12- Qiao Y, Wu M, Feng Y, Zhou Z, Chen L, Chen F (2018) Alterations of oral microbiota distinguish children with autism spectrum disorders from healthy controls. *Sci Rep* 8(1):1597. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19982-y>
- 13- Ngounou Wetie AG, Wormwood K L, Russell S, Ryan JP, Darie CC, Woods A G (2015) A pilot proteomic analysis of salivary biomarkers in autism spectrum disorder. *Autism Res* 8(3):338-350. <https://doi.org/10.1002/aur.1450>
- 14- Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM, Fielden PR, Fogarty SW, Fullwood NJ, Heys KA, Hughes C, Lasch P, Martin-Hirsch PL, Obinaju B, Sockalingum

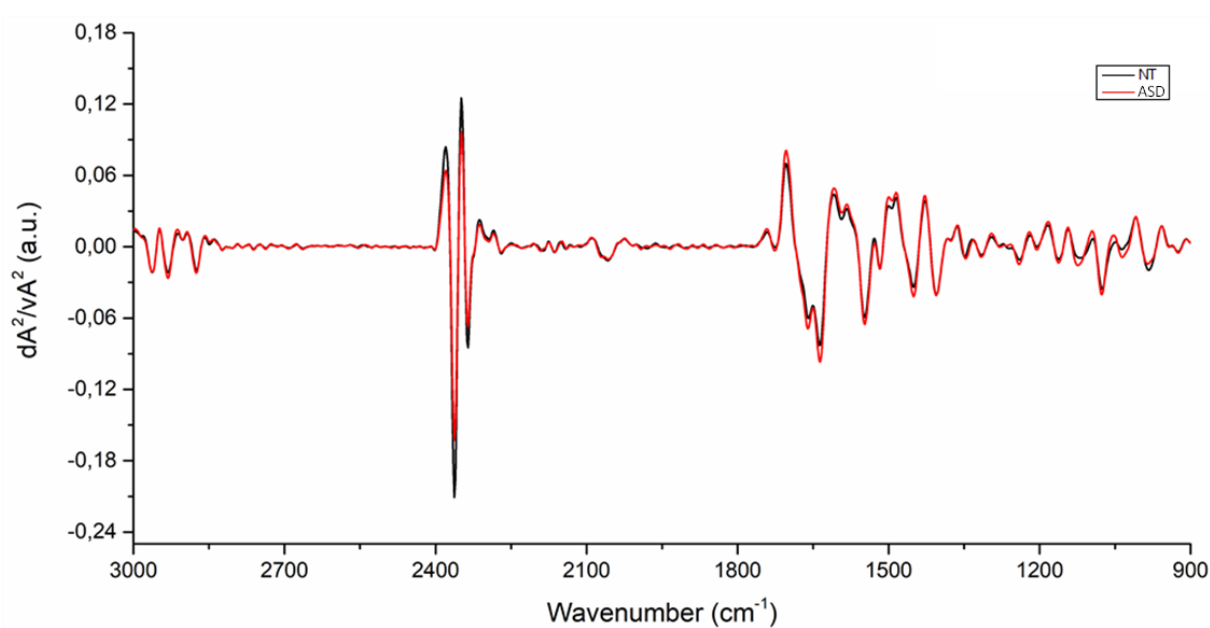
- GD, Sulé-Suso J, Strong RJ, Walsh MJ, Wood BR, Gardner P, Martin FL (2014) Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc* 9:1771–1791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
- 15-** Butler HJ, Brennan PM, Cameron JM, Finlayson D, Hegarty MG, Jenkinson MD, Palmer DS, Smith BR, Baker MJ (2019) Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nat Commun* 10(1):1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12527-5>
- 16-** Khaustova S, Shkurnikov M, Tonevitsky E, Artyushenko V, Tonevitsky A (2010) Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst* 135(12):3183-3192. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>
- 17-** Bellisola G, Sorio C (2012) Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *Am J Cancer Res* 2(1):1-21.
- 18-** Movasaghi Z, Rehman S, Rehman, DI (2008) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev* 43(2):134-179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- 19-** Orphanou CM, Walton-Williams L, Mountain H, Cassella J (2015) The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR. *Forensic Sci Int* 252:e10-16. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.04.020>
- 20-** Stuart BH (2004) Biological Applications. In: Stuart BH (ed) *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp137-165. ISBN 9780470011140
- 21-** Hands JR, Clemens G, Stables R, Ashton K, Brodbelt A, Davis C, Dawson TP, Jenkinson MD, Lea RW, Walker C, Baker MJ (2016) Brain tumour differentiation: rapid stratified serum diagnostics via attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Neurooncol* 127: 463–472. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2060-x>
- 22-** Aoki Y, Yoncheva YN, Chen B, Nath T, Sharp D, Lazar M, Velasco P, Milham MP, Di Martino A (2017) Association of white matter structure with autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity Disorder. *JAMA Psychiatry* 74(11):1120–1128. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.2573>
- 23-** Loomes R, Hull L, Mandy WPL (2017) What is the male-to-female ratio in autism spectrum disorder? A systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 56(6):466-474. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>
- 24-** Halladay AK, Bishop S, Constantino JN, Daniels AM, Koenig K, Palmer K, Messinger D, Pelphrey K, Sanders SJ, Singer AT, Taylor JL, Szatmari P (2015) Sex and gender differences in autism spectrum disorder: summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority. *Mol Autism* 6(1):36. <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0019-y>
- 25-** Rodrigues RP, Aguiar EM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Guedes CC, Siqueira WL, Maia YCP, Cardoso SV, Sabino-Silva R (2019) differential molecular signature of human saliva using ATR-FTIR spectroscopy for chronic kidney disease diagnosis. *Braz Dent J*.30(5):437-445. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902228>
- 26-** Ferreira ICC, Aguiar EMG, Silva ATF, Santos LLD, Cardoso-Sousa L, Araújo TG, Santos DW, Goulart LR, Sabino-Silva R, Maia YCP (2020) Attenuated Total Reflection-Fourier Transform

- Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy analysis of saliva for breast cancer diagnosis. *J Oncol.*2020:4343590. <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>
- 27-** Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Coelho LMD, Oliveira SW, Espindola FS, Raniero L, Crosara KTB, Baker MJ, Siqueira WL, Sabino-Silva R (2020) Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One.* 15(3): e0223461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>
- 28-** Yu MC, Rich P, Foreman L, Smith J, Yu MS, Tanna A, Dibbur V, Unwin R, Tam FWK (2017) Label free detection of sensitive mid-infrared biomarkers of glomerulonephritis in urine using Fourier transform infrared spectroscopy. *Sci Rep* 7(1):4601. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04774-7>
- 29-** Severcan F, Bozkurt O, Gurbanov R, Gorgulu G (2010) FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. *J Biophotonics* 3(8-9):621-631. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000016>
- 30-** Karamouzi A, Kovachev D, Karamouzis I, Antoniadou-Hitoglou M, Tsikoulas I, Aggelopoulou-Sakadami N (2007) Saliva Levels of 15-F2t-Isoprostane as Biomarker of Lipid Peroxidation in Autistic Children. *Eur J Inflamm* 5(3):141-144. <https://doi.org/10.1177/1721727X0700500304>
- 31-** Berding K, Donovan SM (2016) Microbiome and nutrition in autism spectrum disorder: current knowledge and research needs. *Nutr Rev* 74(12):723-736. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw048>
- 32-** Singh S, Ramesh V, Oza N, Balamurali PD, Prashad KV, Balakrishnan P (2014) Evaluation of serum and salivary lipid profile: A correlative study. *J Oral Maxillofac Pathol* 18(1):4-8. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.131881>
- 33-** Siu MT, Butcher DT, Turinsky AL, Cytrynbaum C, Stavropoulos DJ, Walker S, Caluseriu O, Carter M, Lou Y, Nicolson R, Georgiades S, Szatmari P, Anagnostou E, Scherer SW, Choufani S, Brudno M, Weksberg R (2019). Functional DNA methylation signatures for Autism Spectrum Disorder genomic risk loci: 16p11.2 deletions and CHD8 variants. *Clin Epigenetics* 11 (1). 103 <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0684-3>

Supplementary Material



Supplementary Fig. 1 Specific band areas without significant difference between NT and ASD (A-L) $p > 0.05$.



Supplementary Fig. 2 Mean of second derivative ATR-FTIR spectra (4000-400 cm^{-1}) in saliva of neurotypical (NT) and autism spectrum disorder (ASD) subjects.

Referências

- ABOU-DONIA, M. B. *et al.* De novo blood biomarkers in autism: autoantibodies against neuronal and glial proteins. **Behavioral Sciences**, Basel, v. 9, n. 5, p. 47, 2019. DOI:10.3390/bs9050047. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-328X/9/5/47>. Acesso em: ago. 2019.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION *et al.* **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)**. 5th. Arlington: American Psychiatric Pub, 2013.
- ANDREW CHAN, K. L.; KAZARIAN, S. G. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) imaging of tissues and live cells. **Chemical Society Reviews**, London, v. 45, n. 7, p. 1850-1864, Apr 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5CS00515A>.
- APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**, Limerick, v. 150, n. 2-3, p. 119-131, June 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.10.026>.
- ASHWOOD, P. *et al.* Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. **Brain Behavior and Immunity**, Amsterdam, vol. 25, n.1 p.40-5, Jan. 2011. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.08.003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2991432/>, Acesso em: 06 Ago, 2019.
- ASSUMPÇÃO JUNIOR, F. B. *et al.* Escala de avaliação de traços autísticos (A.T.A): segundo estudo de validade. *In: Jornada Apoiar - Saúde Mental E Violência: Contribuições No Campo Da Psicologia Clínica Social*, São Paulo, 2008. **Anais [...]**. São Paulo: Instituto de Psicologia, 2008.
- BAIO, J. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years- autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 63, n. 2, p.1-21. Mar. 2014. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/22182>. Acesso em: 01 ago. 2019.
- BAIO, J. *et al.* Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years — autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 67, n. 6, p.1-23, Apr. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/ss/ss6706a1.htm#suggestedcitation>. Acesso em: 12 nov. 2018.
- BAKER, E. K. *et al.* Assessing a hyperarousal hypothesis of insomnia in adults with autism spectrum disorder. **Autism Research**, Hoboken, v. 12, n. 6, p.897-910, Mar. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aur.2094>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aur.2094>. Acesso em: 05 ago. 2019.

BAKER, M. J, *et al.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, London, v. 9, n. 8, p. 1771-1791, July 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2014.110>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4480339/>. Acesso em: 02 jul. 2018.

BARTON, M. L.; DUMONT-MATHIEU, T.; FEIN, D. Screening Young Children for Autism Spectrum Disorders in Primary Practice. **Journal Of Autism And Developmental Disorders**, New York, v. 42, n. 6, p.1165-1174, Ago. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-011-1343-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10803-011-1343-5>. Acesso em: 02 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes de Atenção à Reabilitação da Pessoa com Transtornos do Espectro do Autismo (TEA)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.

BROWN, A. S. *et al.* Elevated maternal C-reactive protein and autism in a national birth cohort. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v. 19, n. 2, p.259-264, Jan. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.197>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/mp2012197>. Acesso em: 27 jun. 2019.

BRUYNE, S.; SPEECKAERT, M. M.; DELANGHE, J. R. Applications of mid-infrared spectroscopy in the clinical laboratory setting. **Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences**, London, v. 55, n. 1, p.1-20, Dec. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408363.2017.1414142>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408363.2017.1414142>. Acesso em: 07 nov. 2018.

CAETANO JÚNIOR, P. C.; STRIXINO, J. F.; RANIERO, L. Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. **Research On Biomedical Engineering**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p.116-124, June 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2446-4740.0664>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S2446-47402015000200116&script=sci_arttext. Acesso em: 11 set. 2018.

CAIXETA, D. C. *et al.* Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. **Plos one**, San Francisco, v. 15, n. 3, p. e0223461, March 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0223461>. Acesso em: 01 abr. 2020.

CAMPANA, N.T.C.; LERNER, R.; DAVID, V.F. CDRI as an instrument to evaluate infants with developmental problems associated with autism. **Paidéia (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 60, p. 85-93, Apr. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1982-43272560201511>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-863X2015000100085&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 21 out. 2019.

CARPENTER, G. H. The secretion, components, and properties of saliva. **Annual review of food science and technology**, Palo Alto, v. 4, p. 267-276, 2013. DOI: 10.1146/annurev-food-030212-182700 · Source: PubMed. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-030212-182700>. Acesso em: 01 ago. 2018.

CASTAGNOLA, M. *et al.* Hypo-phosphorylation of salivary peptidome as a clue to the molecular pathogenesis of autism spectrum disorders. **Journal Of Proteome Research**, Washington, v. 7, n. 12, p.5327-5332, Dec. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/pr8004088>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/pr8004088>. Acesso em: 10 nov. 2018.

CHAHROUR, M., *et al.* Current perspectives in Autism Spectrum Disorder: from genes to therapy: from genes to therapy. **The Journal Of Neuroscience**, Washington, v. 36, n. 45, p. 11402-11410, Nov. 2016. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2335-16.2016.2016>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27911742>. Acesso em: 15 ago. 2019.

CORBETT, B. A. *et al.* A proteomic study of serum from children with autism showing differential expression of apolipoproteins and complement proteins. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v. 12, n. 3, p.292-306, Dec. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001943>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/4001943>. Acesso em: 25 ago. 2018.

DAWSON, G. *et al.* Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: the early start denver model. **Pediatrics**, Elk Grove Village Il, v. 125, n. 1, p.e17-e23, Nov. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2009-0958>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4951085/>. Acesso em: 20 nov. 2018.

DIETZ, C. *et al.* Screening for Autistic Spectrum Disorder in children aged 14–15 months. ii: population screening with the Early Screening of Autistic Traits questionnaire (ESAT). Design and General Findings. **Journal Of Autism And Developmental Disorders**, New York, v. 36, n. 6, p.713-722, Apr. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-006-0114-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10803-006-0114-1>. Acesso em: 02 abr. 2019.

DURKIN, M. S. *et al.* Socioeconomic inequality in the prevalence of autism spectrum disorder: evidence from a U.S. cross-sectional study. **Plos One**, São Francisco, v. 5, n. 7, p.11551-11558, July 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011551>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011551>. Acesso em: 12 out. 2018.

ECKER, C. Autism biomarkers for more efficacious diagnosis. **Biomarkers In Medicine**, London, v. 5, n. 2, p.193-195, Apr. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.2217/bmm.11.13>.

ELSABBAGH, M. *et al.* Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism Research**, Hoboken, v. 5, n. 3, p.160-179, Apr. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aur.239>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aur.239>. Acesso em: 02 nov. 2018.

EMOND, P. *et al.* GC-MS-based urine metabolic profiling of autism spectrum disorders. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, n. 15, p.5291-5300, Apr. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-6934-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-013-6934-x>. Acesso em: 12 out. 2018.

FERREIRA, I. C. C *et al.* Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy analysis of saliva for breast cancer diagnosis. **Journal Of Oncology**, Cairo, v. 2020, p. 1-11, Feb. 2020. Hindawi Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4343590>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7035572/pdf/JO2020-4343590.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2020.

FUJII, S. *et al.* Diagnosis of periodontal disease from saliva samples using Fourier Transform Infrared Microscopy coupled with partial least squares discriminant analysis. **Analytical Sciences: The International Journal Of The Japan Society For Analytical Chemistry**, Tokyo, v. 32, n. 2, p.225-231, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.32.225>. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/32/2/32_225/_pdf/-char/en. Acesso em: 10 jun. 2019.

GABRIELE, S.; SACCO, R.; PERSICO, A. M. Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. **European Neuropsychopharmacology**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p.919-929, June 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.02.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924977X14000613>. Acesso em: 12 out. 2018.

GAJJAR, K. *et al.* Fourier-transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: a novel diagnostic approach for ovarian cancer. **The Analyst**, Cambridge, v. 138, n. 14, p.3917-3926, July 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c3an36654e>.

GALIANA-SIMAL, A. *et al.* Towards a future molecular diagnosis of autism: recent advances in biomarkers research from saliva samples. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, Oxford, v. 67, p. 1-5, June 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.03.004>. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0736574817303301?token=4C350FDE7619C1684F3688744863C5B581E395B4093B99E2483B0F1C5019BA7DFB913E03DD525C57E57C28D0EEE660D2>. Acesso em: 16 nov. 2018.

GOLDANI, A. A. S. *et al.* Biomarkers in autism. **Frontiers In Psychiatry**, Switzerland, v. 5, p.1-13, Aug. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2014.00100>. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2014.00100/full>. Acesso em: 02 ago. 2018.

HAAS, S. L. *et al.* Spectroscopic Diagnosis of Myocardial Infarction and Heart Failure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Serum Samples. **Applied Spectroscopy**, Thousand Oaks, v. 64, n. 3, p.262-267, Mar. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1366/000370210790918508>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1366/000370210790918508>. Acesso em: 02 ago. 2019.

HAMMOCK, E. *et al.* Examining autism spectrum disorders by biomarkers: example from the oxytocin and serotonin systems. **Journal Of The American Academy Of Child & Adolescent Psychiatry**, New York, v. 51, n. 7, p.712-721.e1, July 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaac.2012.04.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890856712003061>. Acesso em: 03 out. 2018.

HANDS, J. R. *et al.* Investigating the rapid diagnosis of gliomas from serum samples using infrared spectroscopy and cytokine and angiogenesis factors. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, n. 23, p.7347-7355, July. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-7163-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-013-7163-z>. Acesso em: 25 jul. 2019.

HELMERHORST, E. J.; DAWES, C.; OPPENHEIM, F. G. The complexity of oral physiology and its impact on salivary diagnostics. **Oral diseases**, Copenhagen, v. 24, n. 3, p. 363-371, Apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.12780>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/odi.12780>. Acesso em: 10 jul. 2019.

HICKS, S. D. *et al.* Saliva MicroRNA differentiates children with autism from peers with typical and atypical development. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, New York, v. 59, n. 2, p. 296-308, Fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2019.03.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890856719302102>. Acesso em: 01 mar. 2020.

HICKS, S. D. *et al.* Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. **BMC Pediatrics**, London, v. 16, n. 1, p.52. Apr 2016. 16:52. DOI:10.1186/s12887-016-0586-x. Disponível em: <https://bmcpediatr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12887-016-0586-x>. Acesso em: 02 jul. 2019.

HICKS, S. D. *et al.* Validation of a salivary RNA test for childhood autism spectrum disorder. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 9, p. 534, Nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00534>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00534/full?report=reader>. Acesso em: 8 jul. 2019.

HOFMAN, L. F. Human saliva as a diagnostic specimen. **The Journal Of Nutrition**, Rockville, v. 131, n. 5, p.1621-1625, May 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jn/131.5.1621s>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/131/5/1621S/4686814>. Acesso em: 03 set. 2018.

HU, C. *et al.* Alterations in plasma cytokine levels in chinese children with autism spectrum disorder. **Autism Research**, Hoboken, v. 11, n. 7, p. 989-999, Mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/aur.1940>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/aur.1940>. Acesso em: 10 ago. 2019.

HU, Z. *et al.* APOE hypermethylation is associated with autism spectrum disorder in a Chinese population. **Experimental and therapeutic medicine**, Athens, v. 15, n. 6, p. 4749-4754, Apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6069>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.6069?text=abstract#>. Acesso em: 10 jan. 2019.

KACZOR-URBANOWICZ, K. E. *et al.* Saliva diagnostics –current views and directions. **Experimental Biology And Medicine**, London, v. 242, n. 5, p.459-472, Dec. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1535370216681550>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5367650/>. Acesso em: 03 jul. 2019.

KAKARADDI, M.; ATHANI, N.; RAVIKUMAR, H. Sialochemistry a diagnostic tool. **Pakistan Oral & Dental Journal**, Peshawar, v. 32, n. 2, p. 222-225, Aug. 2012.

KARAMOUZI, A. *et al.* Saliva Levels of 15-F2t-Isoprostane as biomarker of lipid peroxidation in autistic children. **European Journal Of Inflammation**, Thousand Oaks, v. 5, n. 3, p.141-144, Sep. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1721727x0700500304>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1721727X0700500304>. Acesso em: 20 dez. 2019.

KHAUSTOVA, S. A. *et al.* Assessment of biochemical characteristics of the saliva using Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. **Bulletin Of Experimental Biology And Medicine**, New York, v. 148, n. 5, p.841-844, Nov. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-010-0831-5>. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Maxim_Shkurnikov/publication/43161298_Assessment_of_Biochemical_Characteristics_of_the_Saliva_Using_Fourier_Transform_Mid-Infrared_Spectroscopy/links/57ea1a4d08aef8bfcc965a19.pdf. Acesso em: 12 out. 2018.

KHAUSTOVA, S. *et al.* Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **The Analyst**, Cambridge, v. 135, n. 12, p.3183-3192, Dec. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c0an00529k>.

KOLEVZON, A. *et al.* Self-injury in autism spectrum disorder: An effect of serotonin transporter gene promoter variants. **Psychiatry Research**, Amsterdam, v. 220, n. 3, p. 987-990, 30 Dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.09.018>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165178114008129>.

Acesso em: 13 nov. 2018.

KONG, X. *et al.* New and preliminary evidence on altered oral and gut microbiota in individuals with Autism Spectrum Disorder (ASD): implications for ASD diagnosis and subtyping based on microbial biomarkers. **Nutrients**, Basel, v. 11, n. 9, p. 2128-2154. Sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11092128>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/9/2128>. Acesso em: out. 2019.

KULAGE, K. M.; SMALDONE, A. M.; COHN, E. G. How will DSM-5 affect autism diagnosis? A systematic literature review and meta-analysis. **Journal Of Autism And Developmental Disorders**, New York, v. 44, n. 8, p. 1918-1932, 16 Feb. 2014. DOI: 10.1007/s10803-014-2065-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10803-014-2065-2>. Acesso em: 20 dez. 2019.

LANDA, R. J. Diagnosis of autism spectrum disorders in the first 3 years of life. **Nature Reviews Neurology**, New York, v. 4, n. 3, p. 138-147, Feb. 2008. DOI:10.1038/ncpneuro0731. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncpneuro0731>. Acesso em: 02 nov. 2019.

LI, L. *et al.* Prenatal progesterone exposure is associated with Autism Spectrum Disorders. **Frontiers In Psychiatry**, Switzerland, v. 9, p.611, Nov. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2018.00611>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6252360/>. Acesso em: 30 jun. 2019.

LI, X. *et al.* Elevated immune response in the brain of autistic patients. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 207, n. 1-2, p. 111-116, Feb. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2770268/>. Acesso em: 10 set. 2019.

LIMA, D. P. *et al.* Saliva: reflection of the body. **International Journal Of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, n. 3, p.e184-e188, Mar. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.04.022>. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(09\)00203-3/pdf](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(09)00203-3/pdf). Acesso em: 03 set. 2018.

LOSAPPIO, M.; PONDÉ, M. P. Tradução para o português da escala M-CHAT para rastreamento precoce de autismo. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 30, n. 3, p.221-229, dez. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-81082008000400011>. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rprs/v30n3/v30n3a11>. Acesso em: 05 jun. 2019.

MALKOVA, N. V. *et al.* Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. **Brain Behavior And Immunity**, Amsterdam, v. 26, n. 4, p. 607-616, Jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.011>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088915911200013X>. Acesso em: 5 jan. 2019.

MANDEL, I. D. The diagnostic uses of saliva. **Journal Of Oral Pathology And Medicine**, Oxford, v. 19, n. 3, p.119-125, Mar. 1990. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.1990.tb00809.x>. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1990.tb00809.x>. Acesso em: 04 jun. 2018.

MEILIANA, A.; WIJAYA, A. Potential biomarkers for diagnosis and screening of Autism Spectrum Disorders. **The Indonesian Biomedical Journal**, Indonesia, v. 6, n. 3, p. 137-56, Dec 2014. DOI: 10.18585/inabj.v6i3.27. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/283586483_Potential_Biomarkers_for_Diagnosis_and_Screening_of_Autism_Spectrum_Disorders. Acesso em: 10 ago. 2018.

MELKE, J *et al.* Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v. 13, n. 1, p.90-98, May 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4002016>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/4002016>. Acesso em: 02 out. 2018.

MELVIN, J. E. *et al.* Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annual Review Of Physiology**, Palo Alto, v. 67, p. 445-469, Mar 2005. DOI: 10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745>. Acesso em: 04 maio 2019.

MILLER, C. S. *et al.* Current developments in salivary diagnostics. **Biomarkers In Medicine**, London, v. 4, n. 1, p. 171-189, Feb 2010. DOI: <https://doi.org/10.2217/bmm.09.68>. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/bmm.09.68>. Acesso em: 4 jun. 2019.

MORTHA, N. *et al.* A systematic review of saliva on its diagnostic utility. **Journal Of Dr. NTR University Of Health Sciences**, Mumbai, v. 7, n. 2, p. 115, June 2018. DOI: 10.4103/JDRNTRUHS.JDRNTRUHS_91_17. Disponível em: <http://www.jdrntruhs.org/article.asp?issn=2277-8632;year=2018;volume=7;issue=2;spage=115;epage=119;aulast=Mortha>. Acesso em: 10 out 2019.

NGOUNOU WETIE, A.G. *et al.* A pilot proteomic analysis of salivary biomarkers in autism spectrum disorder. **Autism Research**, Hoboken, v. 8, n. 3, p. 338-350, June 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/aur.1450>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626423>. Acesso em: ago. 2018.

NGOUNOU WETIE, A. G. *et al.* A pilot proteomic study of protein markers in autism spectrum disorder. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 35, n. 14, p.2046-2054, May 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201300370>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elps.201300370>. Acesso em: 02 ago. 2018.

O'ROAK, B. J. *et al.* Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. **Science**, New York, v. 338, n. 6114, p. 1619-1622, Dec. 2012. DOI: 10.1126 / science.1227764. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/early/2012/11/14/science.1227764?versioned=true>. Acesso em: 16 jun. 2019

OZTAN, O. *et al.* Biomarker discovery for disease status and symptom severity in children with autism. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 89, p.39-45, Mar. 2018. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.12.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306453017313197>. Acesso em: 02 jun. 2019.

PARDO, C. A.; EBERHART, C. G. The neurobiology of autism. **Brain Pathology**, Zürich, v. 17, n. 4, p. 434-447, Oct. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00102.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3639.2007.00102.x>. Acesso em: 10 ago. 2019.

PEREIRA, A.; RIESGO, R. S.; WAGNER, M. B. Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. **Jornal De Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 6, p. 487-494, 14 Oct. 2008. DOI: 10.2223/JPED.1828. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jped/v84n6/en_v84n6a04.pdf. Acesso em: 20 out. 2018.

PFAFFE, T. *et al.* Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 57, n. 5, p. 675-687, May 2011. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article/57/5/675/5620960>. Acesso em: 12 ago. 2019.

QIAO, Y. *et al.* Alterations of oral microbiota distinguish children with autism spectrum disorders from healthy controls. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1597, Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19982-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-19982-y.pdf?origin=ppub>. Acesso em: 27 out. 2019.

RAI, K.; HEGDE, A. M.; JOSE, N. Salivary antioxidants and oral health in children with autism. **Archives Of Oral Biology**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 1116-1120, 21 Apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.03.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996912000969?via%3DiHub>. Acesso em: 13 nov. 2018.

RATAJCZAK, H. V; SOTHERN, R. B. Measurement in saliva from neurotypical adults of biomarkers pertinent to autism spectrum disorders. **Future Science Oa**, London, v. 1, n. 4, p.1-15, Nov. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4155/fso.15.70>. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/10.4155/fso.15.70>. Acesso em: 20 out. 2018.

RODRIGUES, L. M. *et al.* Analysis of saliva composition in patients with burning mouth syndrome (BMS) by FTIR spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 100, p. 195-201, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.12.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203118302480>. Acesso em: 25 jun.2019.

RODRIGUES, L. M. *et al.* Effect of smoking cessation in saliva compounds by FTIR spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 174, p. 124-129, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.11.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142516306631>. Acesso em: 25 jun. 2019.

RODRIGUES, R. P. *et al.* Differential molecular signature of human saliva using ATR-FTIR spectroscopy for chronic kidney disease diagnosis. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 5, p. 437-445, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902228>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402019000500437&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 5 de março de 2020.

ROI, A. *et al.* A new approach for the diagnosis of systemic and oral diseases based on salivary biomolecules. **Disease Markers**, New York, v. 2019, Feb.2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/8761860>. Disponível em: <http://downloads.hindawi.com/journals/dm/2019/8761860.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2019.

SCHWARZ, E. *et al.* Sex-specific serum biomarker patterns in adults with Asperger's syndrome. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v. 16, n. 12, p.1213-1220, Sept. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2010.102>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/mp2010102>. Acesso em: 03 nov. 2018.

SEIZE, M. M.; BORSA, J. C. Instrumentos para rastreamento de sinais precoces do autismo: revisão sistemática. **Psico-usf**, Bragança Paulista, v. 22, n. 1, p.161-176, abr. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-82712017220114>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1413-82712017000100161&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 13 set. 2018.

SGRITTA, M. *et al.* Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of Autism Spectrum Disorder. **Neuron**, Cambridge, v. 101, n. 2, p.246-259 e6, Jan. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.018>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0896627318310092>. Acesso em: 10 ago. 2019.

STUART, B. H. Biological Applications. *In*: STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. p.137-165.

WALLACE, K. S.; ROGERS, S. J. Intervening in infancy: implications for autism spectrum disorders. **Journal Of Child Psychology And Psychiatry**, Oxford, v.

51, n. 12, p.1300-1320, Sept. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7610.2010.02308.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-7610.2010.02308.x>. Acesso em: 20 nov. 2018.

WARD, C. S. Autism's cancer connection: The anti-proliferation hypothesis and why it may matter. **Medical Hypotheses**, New York, v. 82, n. 1, p. 26-35, Jan 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.10.029>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030698771300515X>. Acesso em: 2 maio 2019.

WILLFORS, C *et al.* Medical history of discordant twins and environmental etiologies of autism. **Translational Psychiatry**, New York, v. 7, n. 1, p.e1014, Jan. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2016.269>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/tp2016269#citeas>. Acesso em: 10 out. 2018.

WOODS, A. G. *et al.* Mass spectrometry as a tool for studying autism spectrum disorder. **Journal Of Molecular Psychiatry**, London, v. 1, n. 1, p. 6, 2013. DOI: 10.1186/2049-9256-1-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/2049-9256-1-6>. Acesso em: 07 nov. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Autism Spectrum Disorders**. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health organization, WHO, 2017. www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Autism Spectrum Disorders**. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health organization, WHO, 2019. <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http://id.who.int/icd/entity/437815624>.

WORMWOOD, K. L. *et al.* Salivary proteomics and biomarkers in neurology and psychiatry. **Proteomics - Clinical Applications**, Weinheim, v. 9, n. 9-10, p.899-906, Mar. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201400153>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/prca.201400153>. Acesso em: 12 out. 2018.

XU, N.; LI, X.; ZHONG, Y. Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. **Mediators Of Inflammation**, Sylvania, v. 2015, Jan 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/531518>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/531518/abs/>. Acesso em: 02 maio 2019.

YAP, I. K. S. *et al.* urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls. **Journal Of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 6, p.2996e-3004e, June 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/pr901188e>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr901188e>. Acesso em: 02 out. 2018.