**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Relação entre hábito alimentar e síndrome do espectro autista

Nádia Isaac da Silva

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2011**

Nádia Isaac da Silva
Nutricionista

Relação entre hábito alimentar e síndrome do espectro autista

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

Orientadora:
Profa. Dra. **JOCELEM MASTRODI SALGADO**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Silva, Nádia Isaac da
Relação entre hábito alimentar e síndrome do espectro autista / Nádia Isaac da Silva. - -
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011.
132 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Autismo 2. Dieta 3. Cromatografia líquida de alta eficiência 4. Hábitos alimentares
5. Metabolismo protéico 6. Peptídeos I. Título

CDD 613.2
S586r

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedico

Ao meu senhor Deus

Fonte inesgotável de luz, amor e sabedoria

Aos meus pais

Isaltina Mendes da Silva e Waltenes Isaac da Silva

Ao meu padrasto

Darci de Jesus Pereira da Rocha (Titi)

As minhas irmãs

Vivía e Juliana

Ao meu sobrinho amado

Gabriel (Biel)

A todos os pais de autistas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus, espírito de bondade infinita que esteve comigo nessa caminhada tão difícil.

As instituições CAPES e FEALQ pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

À minha família, pelo seu apoio incondicional em todas as etapas dessa caminhada, em especial ao meu padrasto Titi e minha mãe, companheiros de muitas coletas de urina.

À amiga Elaine M. Kairalla que sempre acreditou nesse projeto mesmo quando tudo parecia impossível.

Ao empresário Sr. Benedito José Rosada que colaborou financeiramente com o projeto e tornou esse sonho possível.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Jocelyne Mastrodi Salgado, pelo apoio nas horas difíceis.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate que colaborou doando materiais para o projeto e também pelo auxílio científico. Sem seu apoio e incentivo não seria possível concretizar esse projeto. Deixo registrado meu profundo respeito e admiração não só pelo profissional competente, mas também pelo ser humano exemplar que me ensinou muito sobre respeito e compaixão pelo próximo. Que Deus te abençoe sempre.

Ao Prof. Dr. Ivo Lebrun que de forma generosa acolheu o projeto em seu laboratório. O seu apoio e participação foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao pesquisador Rafael Marques Porto, pela sua participação, esforço, paciência e ajuda constante.

À Prof^a. Dr^a. Solange Guidolin Caniatti Brazaca pelo seu apoio ao projeto.

As funcionárias do Laboratório de Nutrição Humana da ESALQ: à amiga de sempre secretária Raquel (Raquelzita), à nova amiga secretária Vana, à querida Heloísa (Lolô), à secretária Eliane e à técnica de laboratório Débora.

Aos amigos de laboratório em especial Bruno, Carlos, Priscila, Gabrielle e Maressa.

As estagiárias Mariane Lani e Luiana Azoubel pelo trabalho e dedicação.

Ao estatístico Ricardo Olinda pelo auxílio constante em diversas etapas do projeto.

A todos funcionários do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição da ESALQ, em especial a secretária Gislaine, um anjo que me auxiliou em um momento em que a única opção era desistir.

Aos funcionários do Centro de Especialização Municipal do Autista (CEMA) da cidade de Limeira em especial à terapeuta ocupacional Cilene Falascina, psicóloga Vera, fonoaudióloga Márcia e Flávia.

Aos funcionários do Núcleo de Ensino e Socialização do Autista (NESA), em especial à psicóloga Karine Helena Rodriguez e Sharleyde.

À minha querida amiga e ex-supervisora Heloir de Campos, pelo apoio e compreensão.

À super mãe Arlete Michelin que transformou seu sofrimento em esperança para vários pais de autistas.

Aos pais dos autistas participantes meu profundo respeito, admiração e carinho.

Não sei...

Não sei...

*se a vida é curta
ou longa demais para nós.*

*Mas sei que nada do que vivemos
tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.*

*Muitas vezes basta ser:
colo que acolhe,
braço que envolve,
palavra que conforta,
silêncio que respeita,
alegria que contagia,
lágrima que corre,
olhar que sacia,
amor que promove.*

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Histórico do autismo.....	19
3.2 Síndrome do espectro autista.....	20
3.3 Hábito alimentar e autismo.....	22
3.4 Autismo e alterações do aparelho digestório	25
3.5 Alterações do metabolismo proteico e autismo	27
3.5.1 Peptídeos opioides exógenos e autismo	28
3.5.1.1 Sistema opioide endógeno.....	28
3.5.1.2 Peptídeos opioides derivados de alimentos	33
3.5.1.3 Peptídeos opioides derivados do trigo.....	35
3.5.1.4 Peptídeos opioides derivados do leite	36
3.5.1.5 Teoria do excesso de peptídeos opioides e autismo.....	37
3.5.1.6 Mecanismos envolvidos na teoria de sobrecarga de peptídeos opioides.....	40
3.5.1.7 Aumento da permeabilidade intestinal.....	40
3.5.1.8 Alterações na produção de enzimas em autistas	41
3.5.1.9 Alterações do sistema imunológico	44
3.5.1.10 Síntese da hipótese.....	46
3.5.1.11 Biomarcadores	48
3.5.2 Alterações do metabolismo da creatina.....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Triagem dos participantes	51
4.1.1 Recrutamento de participantes.....	51
4.1.2 Critério de inclusão e exclusão dos autistas na pesquisa	52
4.1.3 Critério de inclusão e exclusão dos participantes do grupo controle	52
4.1.4 Caracterização da população	53
4.2 Avaliação psicológica	53

4.3 Anamnese nutricional	54
4.3.1 Dados sócio-demográficos.....	54
4.3.2 Histórico pessoal de doenças	54
4.3.3 Comportamento inadequado durante as refeições	54
4.3.4 Levantamento de hábito alimentar	55
4.4 Registro fotográfico de comportamento inadequado dos autistas durante as refeições.	56
4.5 Análise da concentração de creatinina	56
4.6 Padronização de método para cromatografia líquida de alta performance.....	57
4.6.1 Desenvolvimento do método.....	58
4.7 Análise estatística	60
5 RESULTADOS....	61
6 DISCUSSÃO.....	101
7 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
ANEXOS.....	123

RESUMO

Relação entre hábito alimentar e síndrome do espectro autista

O autismo é uma síndrome que afeta todas as áreas do comportamento humano. Sua etiologia não está definida. Os estudos descreveram uma associação do autismo com diversas anormalidades fisiológicas entre elas, distúrbios relacionados ao metabolismo proteico. A teoria do excesso de peptídeos opioides afirma que o consumo de glúten e caseína pode intensificar o comportamento da síndrome do espectro autista. Outra hipótese é de que distúrbios do metabolismo da creatina também estão integrados à doença. Os objetivos desse estudo foram: avaliar a variedade e a frequência de alimentos consumidos por autistas, bem como a adequação desse consumo; avaliar as alterações do metabolismo da creatina; desenvolver testes preliminares para determinar as condições mais adequadas para a identificação e possível quantificação dos peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína por HPLC. Para atingir esses objetivos foi elaborada uma anamnese nutricional, contendo questões sobre características sócio-demográficas das famílias dos autistas participantes, histórico pessoal de doenças, comportamento autista durante as refeições, e levantamento de hábito alimentar. Para caracterizar o quadro clínico da população foi realizada uma avaliação psicológica com aplicação do método quantitativo Childhood Autism Rating Scale (CARS) e a identificação de presença de retardo mental foi através de levantamento de avaliação clínica existente, feita por equipe multidisciplinar das instituições participantes. A concentração de creatinina na urina dos autistas e grupo controle formado por parentes do mesmo sexo foi determinada pelo método de Jaffé. Os resultados sobre a caracterização da população indicaram que 1/3 dos pais de autistas possuem baixa escolaridade e 60% renda familiar na faixa de 2 a 4 salários mínimos. Segundo o método de avaliação CARS 64% dos autistas são casos graves. A rinite alérgica é a patologia de maior prevalência na população estudada. Em média 60,71% dos autistas apresentam sintomas gástricos, sendo o mais frequente a flatulência (39,90%). O registro sobre comportamento alimentar identificou que 50% dos autistas expressam o comportamento de comerem muito rápido e 46,43% consomem porções exageradas de alimentos. Esse fato influencia diretamente o hábito alimentar. A avaliação de adequação de consumo de nutrientes revelou que 57,14% têm o consumo de energia superior ao recomendado e baixo consumo de fibras, ácido ascórbico e cálcio. As análises de concentração de creatinina revelaram que os valores são significativamente inferiores em crianças autistas e do grupo controle formado por parentes distantes e que são similares quando comparado com grupo formado por seus pais. As análises iniciais por cromatografia líquida de alta performance evidenciam que dos dois métodos desenvolvidos o codificado como número 2 é mais eficiente do que o número 1, pois consegue distinguir os picos de todos os padrões de peptídeos testados e que o protocolo inicial para a extração de peptídeos opioides em fase sólida deve ser revisto.

Palavras-chave: Autismo; Peptídeos opioides; Dieta; Cromatografia líquida de alta performance

ABSTRACT

Relationship between food habits and autistic spectrum

Autism is a syndrome that affects all areas of human behavior. Its etiology is not defined. The studies described an association of autism with various abnormalities including physiological disorders related to protein metabolism. The theory of excess opioid peptides says that consumption of gluten and casein can intensify the behavior of autistic spectrum syndrome. Another hypothesis is that disorders of creatine metabolism are also integrated to the disease. The objectives of this study were to assess the variety and frequency of foods consumed by autism, as well as the appropriateness of this consumption and to evaluate the changes of creatine metabolism, developing preliminary tests to determine the most appropriate conditions for the identification and possible quantification of opioid peptides derived from gluten and casein by HPLC. To achieve these objectives was drawn up a nutritional interview containing questions on sociodemographic characteristics of the families of autistic participants, personal history of disease, autistic behavior during meals, and a survey of eating habits. To characterize the clinical status of the population a psychological evaluation was performed using a quantitative Childhood Autism Rating Scale (CARS). The creatinine concentrations in urine of autistic and control group formed by relatives of the same sex was determined by the Jaffé. The results on the characterization of the population indicated that one third of parents of autistic children have lower education and 60% of family income in the range from 2 to 4 minimum wages. According to the method of evaluation CARS 64% of autistic children are severe cases. The allergic rhinitis is the most prevalent disease in this population. On average 60.71% of people with autism have gastric symptoms, the most frequent flatulence (39.90%). The record on eating behavior found that 50% of autistic children express the behavior of eating too fast, and 46.43% consume excessive portions of food. This fact directly influences the food habits. The assessment of adequacy of nutrient intake have revealed that 57.14% of energy consumption and lower than the recommended intake of fiber, and calcium acid ascorbic. The analysis revealed that creatinine concentration values are significantly lower in autistic children and the control group formed by distant relatives and are compared with similar group formed by his parents. Initial analysis by high performance liquid chromatography showed that the two methods developed and coded as number 2 is more efficient than a number, for it can distinguish the peaks of all patterns of peptides tested and that the initial protocol for the extraction of opioid peptides in the solid phase should be reviewed.

Keywords: Autism; Opioid peptides; Diet; High performance liquid chromatography

1 INTRODUÇÃO

O autismo, também conhecido como transtorno autístico, autismo da infância e autismo infantil precoce, está incluso na categoria dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TID), uma família de condições marcada pelo início precoce de atrasos e desvios do comportamento e do desenvolvimento os quais perduram por toda a vida (KLIM, 2006).

A sua etiologia é desconhecida, mas dentre os transtornos psiquiátricos é considerado o de maior relação com fatores genéticos. Devido à grande variabilidade das manifestações sintomatológicas, até o momento não foi possível determinar qualquer aspecto biológico, ambiental, ou da interação entre ambos, que contribua de forma decisiva para as manifestações do transtorno (SILVA; MULIK, 2009).

O diagnóstico é feito por avaliação clínica associada à aplicação de critérios de diagnósticos específicos para autismo. Até o momento não existem exames laboratoriais específicos para identificar a doença.

A falta de exames ou sinais clínicos levou grupos de pesquisadores a procurar biomarcadores. Os resultados destes estudos evidenciaram várias alterações biológicas como: concentração anormal de citocinas inflamatórias circulante, inflamação intestinal não específica, elevada produção de leucócitos, alterações do metabolismo energético e proteico.

No início da década de 80 estudos descreveram elevadas concentrações de aminoácidos e peptídeos de origem alimentar no sangue, no fluido cerebrospinal e na urina de autistas. A partir dos achados surgiram algumas hipóteses sobre a possível relação entre autismo e distúrbios do metabolismo proteico.

A teoria da sobrecarga do sistema opioide correlaciona o consumo das proteínas caseína derivada do leite e glúten proveniente do trigo ao agravamento dos sintomas do transtorno autístico. Segundo esta hipótese alterações das estruturas ou do funcionamento do aparelho digestório associadas à deficiência enzimática de proteases responsáveis pela hidrólise dessas proteínas conduzem a elevada concentração de peptídeos opioides circulante. Esses compostos por terem ação semelhante ao peptídeo opioide endógeno β -endorfina atuam sobre o sistema nervoso central, induzindo ao agravamento da patologia. Outro mecanismo envolvido é a reação

autoimune as proteínas caseína e glúten como também aos seus respectivos peptídeos. Essa reação imunológica pode induzir a alterações neuronais que tem como consequência mudança do comportamento.

Estudos relatam que indivíduos autistas, os quais aderiram a uma dieta isenta de caseína e glúten, apresentaram melhora dos sintomas.

Alterações do metabolismo da creatina também foram identificadas. Estudos relatam baixos níveis de creatinina na urina de crianças autistas.

Apesar das evidências os mecanismos de ação para as duas alterações metabólicas citadas não são totalmente conhecidos, bem como a relação dessas condições fisiológicas com os fatores externos.

Os resultados dos estudos realizados até o momento são controversos e muitas críticas são feitas como, por exemplo, a falta do conhecimento do padrão de consumo proteico que poderia desencadear uma crise e a ausência de biomarcadores seguros que identifiquem essas anormalidades metabólicas.

Por todo o exposto o conhecimento do hábito alimentar e principalmente o desenvolvimento de métodos de análises que comprovem concentrações inadequadas de peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína ainda é um desafio.

Hoje é necessária a realização de pesquisas para criar metodologias de análise de peptídeos opioides em fluidos corpóreos mais confiáveis, passíveis de reprodução. Na literatura os resultados positivos obtidos em estudos não são replicáveis, criando uma lacuna para a compreensão da relação entre alimentação e comportamento autista.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Identificar padrão alimentar de uma população de indivíduos autistas e desenvolver testes para desenvolvimento de análises para biomarcadores que associem o agravamento do quadro clínico e alterações no metabolismo proteico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a variedade e a frequência de alimentos consumidos por autistas
- Identificar a adequação do consumo de macro e micronutrientes
- Avaliar as alterações do metabolismo da creatina
- Desenvolver testes preliminares para determinar as condições mais adequadas para a identificação e possível quantificação dos peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína por Cromatografia Líquida de Alta Performance.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico do autismo

O autismo é uma patologia que acompanha a humanidade desde os tempos primórdios. A literatura tem descrito casos isolados de crianças com severos distúrbios mentais decorrentes de importantes alterações nos processos normais do desenvolvimento que, de acordo com a atual classificação, preencheriam os critérios de diagnósticos para o transtorno autístico (MALSON, 1964).

Documentos do período da antiga mesopotâmia descrevem indivíduos com comportamento característico do autismo (KNIVSBERG et al., 2003). Em 1798 foi relatado o de um menino que se apresentava insensível a sons fortes ou brandos, costumava cheirar todos os objetos, emitia sons guturais, mantinha-se atento apenas aos objetos de seu interesse e parecia estar em profunda melancolia. Na época ele foi proclamado como Victor o menino selvagem de Aveyron. Após quase três séculos John Hard, Lorna Wing e Uta Frith reavaliaram o caso e concluíram que sem dúvida Victor era um autista (HILL; FRITH, 2003; WOLFF, 2004).

John Haslan em 1809 publicou o livro “Observations on Madness and Melancholy”. No capítulo intitulado “Cases of insane children” relatou o caso de um menino de sete anos, com atraso na aquisição da linguagem, preocupações obsessivas e isolamento social. Outro registro foi em 1879 onde Henry Maudsley, em seu livro, “The Patology of Mind” inclui um capítulo denominado “The insanity of early life”, referindo-se as insanidades afetivas e morais, observadas em um adolescente com treze anos de idade (WOLFF, 2004).

Em 1908, Sancta de Santis descreveu a “Dementia Praecocissima” baseado em excepcionais observações de quadros de demência em três pré-púberes, um deles apresentava quadro clínico de retardo mental associado a características de autismo (WOLFF, 2004).

Apesar de vários relatos sobre quadros clínicos que se assemelham ao autismo, apenas em 1911 o termo “autismo infantil” foi citado pelo psiquiatra suíço, Eugene Bleuler para designar a perda do contato com a realidade de pacientes esquizofrênicos

que acarretava uma grande dificuldade ou impossibilidade de comunicação (GADIA; TUCHMAN; ROTTA; 2004; KLIN, 2006).

Em 1943 o pesquisador Leo Kanner descreveu pela primeira vez, 11 casos em artigo intitulado de “Distúrbios Autísticos do Contato Afetivo”. Em comum nesses 11 casos, havia uma “incapacidade de emocionar-se” de forma usual com as pessoas desde o início da vida. Kanner também observou respostas incomuns ao ambiente, que incluíram maneirismos motores estereotipados, resistência a mudanças ou insistência na monotonia, bem como aspectos não usuais das habilidades de comunicação da criança, definindo-o como “Autismo Infantil Precoce” (KANNER, 1943).

3.2 Síndrome do espectro autista

Após a publicação de Kanner (1943), os termos esquizofrenia infantil, psicose autista ou psicose simbiótica, tríade de empobrecimento social foram sugeridos para classificar o autismo. Apenas em 1980 a Associação Americana de Psiquiatria (APA) publicou a primeira definição clínica oficial (PHETRASUWAN; MILES; MESIBOV, 2009).

Atualmente o autismo é classificado como um Transtorno Invasivo do Desenvolvimento caracterizado pelo início precoce na infância. Essa patologia é marcada por permanente prejuízo da interação social, alteração da comunicação e padrões limitados ou estereotipados de comportamento e interesses (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004).

O fenótipo é heterogêneo tanto em relação ao perfil da sintomatologia quanto ao grau de acometimento. Os quadros clínicos variam desde aqueles, em que o comprometimento nas áreas da interação social, comunicação e comportamento são severos, associados a profundo retardo mental, passando pelo autismo tal como foi descrito inicialmente por Kanner, em que o grau de comprometimento é moderado. Existem relatos mostrando quadros de autismo em que os indivíduos apresentam bom rendimento intelectual. Aproximadamente 60 a 70% dos autistas manifestam retardo mental e 15 a 30% apresentam convulsões. O sexo masculino é mais afetado e

segundo estudos, as proporções médias são de 3,5 a 4 homens para 1 mulher (KLIN, 2006).

Até a presente data não existem exames laboratoriais específicos que confirmem a patologia. O diagnóstico é basicamente realizado por observação clínica associada à aplicação de critérios de diagnósticos específicos para autismo (LEONARD et al., 2010).

Em vários países da Europa e da América do Norte, incluindo os Estados Unidos e o Canadá, especialistas na área recomendam que o diagnóstico seja feito com base nos critérios estabelecidos pela Classificação Internacional de Doenças CID-10 (OMS, 1992) e/ou pelo Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais da Academia Americana de Psiquiatria DSM-IV-TR (APA, 2003) (LEONARD et al., 2010; SILVA; MULIK, 2009).

Para que uma criança seja diagnosticada como autista obrigatoriamente os distúrbios devem manifestar nos primeiros 36 meses de vida em três áreas: interação social, comunicação e interesses restritos e padrões estereotipados do comportamento (CID-10, 1992).

O aumento da prevalência do autismo nas últimas décadas é um consenso para a comunidade científica. Os primeiros estudos epidemiológicos indicavam uma prevalência de 4 a 5 casos de autismo para cada 10.000 nascimentos (SILVA; MULIK, 2009). Estudos como o de Chakrabarti e Fombonne (2005), estimam um aumento alarmante, atingindo a média de 22 casos para cada 10.000 nascimentos.

Os prováveis fatores responsáveis por esse aumento são o diagnóstico precoce, a inclusão de casos mais leves e mudanças constantes dos critérios de diagnóstico (LEONARD et al., 2010).

A etiologia do autismo é desconhecida, envolve uma complexa interação entre múltiplos e variados genes susceptíveis, fatores epigenéticos e fatores ambientais. Pesquisas sobre a patofisiologia do autismo sugerem mecanismos potenciais múltiplos, que servem como base para explicar o fenótipo heterogêneo (BERTOGLIO; HENDREN, 2009).

A fundamentação de base genética é consenso. Estudos com gêmeos têm demonstrado que em monozigóticos (MZ) a concordância para o autismo varia de 36 a

92%, em contraste com gêmeos dizigóticos (DZ), onde a concordância é nula ou baixa (FOLSTEIN; RUTTER, 1977).

Apesar dos grandes avanços do conhecimento, até o momento não foi possível identificar genes específicos. Para Folstein e Rosen-Sheidley (2001), o autismo está associado a anormalidades de praticamente todos os cromossomos. Pesquisadores afirmam que pelo menos 10 a 15 genes diferentes devem interagir para levar a um fenótipo de autismo (SILVA; MULIK, 2009).

As pesquisas apontam alterações nas regiões 2q, 7q31-q36, 15q11-q13 e 16p13. Anormalidades genéticas nos cromossomos 7 e 15 (mais especificamente, na região 15q11-q13) resultam em fenótipos que variam de atrasos no desenvolvimento e na linguagem até o autismo (BERTOGLIO; HENDREN, 2009; DYKENS; SUTCLIFFE; LEVITT, 2004; SILVA; MULIK, 2009).

A gama de fatores ambientais relacionada ao autismo é variada. Artigos relatam a exposição materna em período pré-natal ou no início do pós-natal a infecções virais e medicamentos como ácido valpróico ou talidomida. Alguns gatilhos ambientais sugeridos por alguns grupos de pesquisadores são bastante controversos, como é o caso da exposição de crianças ao vírus da catapora, rubéola e caxumba como também a vacina tríplice viral (MMR) (BERTOGLIO; HENDREN, 2009).

A procura por biomarcadores revelou a ocorrência de diversas disfunções biológicas como resposta imunológica anormal, alterações do metabolismo xenobiótico, disfunções da síntese de colesterol, distúrbios no metabolismo energético e proteico (ALBERTI et al., 1999; AL-MOSALEM et al., 2009; PARDO-GOVEA; SOLÍS-ÁÑE, 2009; REICHELT et al., 1991; TIERNEY et al., 2001).

3.3 Hábito alimentar e autismo

Apesar de não estar incluso no conjunto de alterações comportamentais característicos do transtorno autístico, manifestações inadequadas relacionadas com a alimentação estão presentes em 30 a 90% dos casos. Na literatura artigos publicados documentam uma variedade de comportamentos que são classificados em três

categorias: seletividade baseada no grupo e textura do alimento, recusa de alimentos e comportamentos de indisciplina durante as refeições (JOHNSON et al., 2008).

Os comportamentos relacionados à seletividade são caracterizados por escolha de uma variedade limitada de alimentos ou consumo inadequado de uma variedade de alimentos que podem acarretar ingestão inadequada de nutrientes (MUNK; REPP, 1994).

Os comportamentos relacionados à recusa têm como principal característica a rejeição frequente de alimentos. Essa rejeição prejudica de forma marcante o consumo de nutrientes. Em caso de crianças, a ingestão de calorias pode comprometer o ganho ponderal e crescimento linear (FIELD; GARLAND; WILLIAMS, 2003).

Os comportamentos de indisciplina durante as refeições interferem no consumo de alimentos e na adequação nutricional. Nessa classe as manifestações mais citadas pela literatura são: crises de choro, agitação, agressividade, autoagressão e comportamento disruptivo (cuspir na comida, deixar a mesa, jogando a comida fora do prato) (AHEARN et al., 2001).

As anormalidades comportamentais relacionadas à alimentação provavelmente estão associadas aos distúrbios centrais do autismo. O déficit de interação social somado à falta de maturidade para a interação social e modelos adequados de comportamentos para as refeições podem dificultar o aprendizado de crianças autistas em diversas atividades, por exemplo, comer com utensílios apropriados (LUKENS; LINSCHIED, 2008).

Muitos autistas não desenvolvem habilidades de comunicação. Esse fato os impede de expressar suas necessidades como fome, saciedade, preferências alimentares e desconforto após as refeições (LUKENS; LINSCHIED, 2008).

O comportamento repetitivo e o interesse restrito podem ter um papel importante na seletividade dietética. Eles por serem resistentes a novas experiências provavelmente transferem esse mesmo padrão de comportamento para a inclusão de novos alimentos. Alguns autistas têm hipersensibilidade sensorial e por esta razão rejeitam alimentos e apresentam aversão à textura, temperatura ou outras características de alimentos (HERNDON, et al., 2009).

Existem poucos estudos publicados sobre adequação de consumo de nutrientes de indivíduos autistas ou pesquisas que compararam a ingestão com grupo controle. Os resultados dos trabalhos são conflitantes e isso dificulta a definição de um padrão alimentar específico da síndrome (JOHNSON et al., 2008).

Raiten e Massaro (1986) avaliaram o consumo alimentar de 40 crianças autistas por sete dias e compararam com o grupo controle composto por 34 crianças com desenvolvimento típico. Nessa pesquisa não foi observada diferença significativa na adequação de consumo de nutrientes entre os dois grupos.

Cornish (1998) analisou o histórico alimentar de 3 dias de 17 autistas e comparou com as recomendações diárias. O resultado revelou que 53% dos participantes consumiam quantidade insuficiente de um ou mais nutriente. O baixo consumo de cálcio, ferro, piridoxina (vitamina B6), ácido ascórbico (vitamina C), vitamina D e zinco foi observado em uma ou mais crianças autistas.

O autor também observou que a ingestão de proteína, retinol (vitamina A), tiamina, vitamina B12, ácido fólico, sódio, potássio, magnésio, fósforo e cobre foi adequada para todos os autistas.

O estudo também utilizou um questionário de frequência de consumo de grupos de alimentos para identificar os mais consumidos pelos autistas. Os resultados demonstraram que os participantes não consumiam quantidades adequadas de frutas e hortaliças e ingeriam quantidades elevadas de alimentos ricos em gordura e açúcar.

Na pesquisa de Schreck, Williams e Smith (2004), 138 pais de crianças autistas e 298 de crianças com desenvolvimento normal responderam a um questionário sobre preferência alimentar com o objetivo de avaliar a variedade de alimentos aceitos pelas crianças. Os autores observaram que o consumo de frutas, laticínios e hortaliças das crianças autistas era inferior ao do grupo controle.

Levy et al. (2007) examinaram o consumo alimentar de 62 crianças com transtorno do espectro autista por 3 dias. Nesse trabalho apenas a adequação de macronutrientes foi analisada. Os pesquisadores concluíram que os autistas tinham ingestão elevada de proteína, mas adequada de calorias, carboidrato e gordura.

No estudo preliminar de Johnson et al. (2008), foram avaliados o hábito alimentar e a ingestão de nutrientes de 19 crianças autistas com faixa etária de 2 a 4

anos e comparados com o grupo controle formado por 15 crianças com desenvolvimento normal e de faixa etária similar. Nesse trabalho não foi encontrada diferença significativa da ingestão de nutrientes entre autistas e grupo controle.

3.4 Autismo e alterações do aparelho digestório

A primeira evidência da relação entre disfunções do trato digestório e transtorno autístico foi descrita em 1971 por Goodwin, Cowen e Goodwin, que identificaram em um grupo de crianças autistas o quadro de má absorção intestinal.

O resultado dessa pesquisa estimulou a investigação do aparelho digestório dessa população e diferentes alterações foram identificadas como: a baixa concentração de α -1antitripsina, elevada excreção fecal de calprotectina, deficiência de enzimas proteolíticas, permeabilidade intestinal anormal e deficiência da enzima fenol-sulfotransferase (ALBERTI et al., 1999; D'EUFEMIA et al., 1996; REICHEL et al., 1991; SMITH et al., 2009; WALKER-SMITH; ANDREWS, 1972).

Estudos também descreveram um quadro inflamatório intestinal caracterizado por grande número de nódulos linfoides na região do duodeno e enterocolite não específica com possível etiologia autoimune em subgrupos de crianças com autismo regressivo (FURLANO et al., 2001; TORRENTE et al., 2002; WAKEFIELD et al., 2000).

A composição da microbiota intestinal também foi pesquisada. Alguns artigos relatam níveis elevados de bactérias do gênero *Clostridium* na cultura de fezes de crianças autistas. A causa provável é a elevada incidência de doenças infecciosas nessa população durante a infância que conduz ao consumo constante de antibióticos que tem como consequência o desequilíbrio da microflora intestinal (PARRACHO et al., 2005).

O achado mais promissor até o momento é a presença de elevada concentração de *trans*-indolil-3-acrililglicina (IAG) na urina de autistas que foi postulada por Mills, Savery e Shattock (1998) e Shattock et al. (1990) como provável biomarcador de disfunções do trato digestório. Esse composto é resultante do catabolismo do aminoácido triptofano. Alterações do metabolismo do triptofano estão associadas a

quadros clínicos de doenças intestinais, neurológicas e psiquiátricas (MARKLOVA; MAKOVÍČKOVÁ; KRÁKOROVÁ, 2000).

Em 2009, Campbell e colaboradores identificaram no *locus* 7q31 uma variação funcional do gene que codifica o fator de transição epitelial-mesenquimal (MET) do receptor de tirosina kinase. Os autores sugerem que a alteração da sinalização do MET contribui para o risco de transtorno do espectro autista associado a alterações do trato digestório. Esse foi o primeiro trabalho a descrever uma possível causa genética para a relação entre autismo e doenças do trato digestório.

Apesar das evidências, a heterogeneidade das condições relacionadas ao trato digestório e ausência de um quadro específico não permitem até o momento definir uma relação causal. A elevada prevalência de sintomas gastrointestinais nessa população é o fator que permite essa associação (GILGER; REDEL, 2009).

A prevalência de sintomas gástricos em crianças autistas é alta 46-76%, quando comparada a crianças com desenvolvimento normal 10-30% (GOLDBERG, 2004). Os sintomas comumente descritos em estudos são: refluxo, diarreia crônica, constipação, flatulência excessiva e distensão abdominal (LEVY et al., 2007).

Em um levantamento com pais e parentes de quinhentas crianças autistas, concluiu-se que 50% destes apresentavam sintomas de diarreia, 50% flatulência e 36% constipação moderada ou severa (LIGHTDALE; SIEGEL; HEYMAN, 2001).

Horvath e Perman (2002) fizeram um levantamento do histórico pessoal de doenças de 412 autistas em clínicas especializadas e associaram os dados com o resultado de entrevistas de pais de autistas. Posteriormente compararam esses dados com o histórico do grupo controle composto por 43 crianças normais. Eles concluíram que a prevalência de sintomas gástricos na população de autistas foi elevada quando comparado com o grupo controle. Os sintomas mais frequentes identificados foram, flatulência (54%), desconforto abdominal (44%), inchaço (34%) e vômito (24%).

Em um estudo retrospectivo Afzal e colaboradores (2003), avaliaram radiografias do abdômen de 103 crianças autistas encaminhados ao serviço de gastroenterologia infantil e comparou com radiografias do abdômen de 29 crianças saudáveis que compareceram ao serviço de emergência com sintomas intestinais. A ocorrência de constipação intestinal moderada e severa em autistas foi maior (36%) do que em

crianças normais (10%). A obstrução moderada ou severa na região retossigmoide também foi superior nos autistas (54,4%) quando comparado com o grupo controle (24,1%).

A consistência das fezes alterada é um sintoma comumente observado em autistas. Em um estudo de coorte, no qual 62 autistas foram avaliados, 54% apresentaram evacuação de fezes com consistência anormal (pastosa ou semilíquida).

Apesar desse resultado os pesquisadores não encontraram relação com disfunções do trato digestório comumente relatadas em vários estudos como doença celíaca, inflamação intestinal não específica, alteração da permeabilidade intestinal e sintomas de má absorção (LEVY et al., 2007).

O estudo mais recente de Smith et al. (2009), confirmou maior prevalência de sintomas gástricos em crianças autistas do que no grupo controle formado por crianças normais. Eles também observaram que não houve diferença estatística da prevalência de sintomas gástricos entre autistas e grupo controle formado por crianças especiais (com outras doenças do desenvolvimento neurológico).

3.5 Alterações do metabolismo proteico e autismo

A primeira evidência foi descrita a mais de 40 anos por Hans Asperger (1961) que sugeriu uma possível relação entre doença celíaca e autismo.

Estudos posteriores identificaram em urina e diversos fluidos corpóreos de autistas, elevadas concentrações de peptídeos, aminoácidos e metabólitos derivados do catabolismo proteico. A partir desses resultados algumas teorias sobre a relação entre consumo de proteína e autismo foram postuladas.

A mais popular é a teoria do excesso de peptídeos opioides muito difundida por profissionais e pais de autistas. Recentemente indícios de alterações do metabolismo da creatina foram identificados.

3.5.1 Peptídeos opioides exógenos e autismo

3.5.1.1 Sistema opioide endógeno

O sistema opioide endógeno é formado por um conjunto de receptores e peptídeos ligantes endógenos que estão distribuídos no sistema nervoso central e tecidos periféricos como o sistema imune, cardiovascular, endócrino e trato digestório (BODNAR, 2009).

Esse sistema é crucial para a manutenção da homeostase e sobrevivência do organismo e devido a sua ampla distribuição regula diversas respostas fisiológicas como a transmissão da nocicepção, atividade cardiovascular e ciclo circadiano. Ele também regula os níveis de ansiedade, caráter depressivo, perfil locomotor, memória, comportamento e atua no desenvolvimento do sistema nervoso central, pois opera na proliferação, migração e diferenciação celular cerebral (BODNAR, 2009; TRIGO et al., 2010; ZAGON; MCLAUGHLIN, 1983 apud WAKEFIELD, et al., 2002).

A existência de membranas receptoras para drogas opioides no cérebro foi relatada em 1973 por três grupos de pesquisa independentes. No período entre a década de 70 e 90 foram identificados e clonados receptores opioides sendo os mais estudados o μ (mu), δ (delta), κ (kappa) e ORL-1 (BODNAR, 2009; TRIGO et al., 2010).

Estudos que utilizaram critérios farmacológicos sugerem a existência de subtipos de receptores, entretanto, foram isolados genes que codificam um subtipo de cada uma das famílias de receptores que foram devidamente caracterizados (receptores μ , δ e κ). Uma explicação é de que os subtipos de receptores surgem de variantes de “*splicing*” alternativo de um gene comum (PASTERNAK; STANDIFER, 1995).

O receptor μ é caracterizado por ter grande afinidade pela morfina. Ele está distribuído ao longo do neuroaxis; a maior concentração desse receptor está presente no putâmen caudado e em ordem decrescente nos seguintes: neocórtex, tálamo, núcleo acúmbens, hipocampo e amígdala. Está presente nas camadas superficiais da espinha dorsal e nos terminais pré-sinápticos das fibras aferentes primárias de nocicepção (FERRAZ, 1999).

Os seus agonistas endógenos são as encefalinas, endomorfina, β -endorfina e dinorfina A. Estudos farmacológicos identificaram subtipos de receptores μ sendo μ_1 , μ_2 e μ_3 . A ligação de opioides agonistas ao receptor μ_1 resulta em analgesia supraespinal e dependência física; a ligação ao receptor μ_2 resulta em analgesia espinal, miose, depressão respiratória, retenção urinária, produção de prolactina, sedação, inibição da motilidade gastrointestinal e bradicardia (TRESCOT et al., 2008).

Os principais agonistas endógenos do receptor δ são as encefalinas e β -endorfina. Ele possui uma distribuição mais restrita no sistema nervoso central em relação aos outros receptores. A maior concentração é no bulbo olfatório, neocórtex, putâmem caudado e núcleo acúmbens. O tálamo e hipotálamo têm uma concentração menor. Estudos imunocitoquímicos em nível ultraestrutural relatam a existência de receptores δ pré-sinápticos responsáveis pela influência inibitória dos opioides na emissão dos neurotransmissores e nos terminais de fibras aferentes primárias da espinha dorsal de ratos. Pesquisas descrevem dois subtipos de receptores δ sendo δ_1 e δ_2 . A estimulação desse receptor está relacionada à analgesia, euforia e dependência física (FERRAZ, 1999; PORTOGHESE et al., 1992; TRESCOT et al., 2008).

O receptor κ foi identificado na camada interna do córtex cerebral, substância nigra e nos núcleos interpendunculares. O seu principal agonista endógeno é a dinorfina A. Foram identificados subtipos do receptor κ sendo κ_1 , κ_2 e κ_3 . A ligação de opioides agonistas com esse receptor induz a analgesia espinal ou supraespinal, sedação, dispneia, efeitos psicomiméticos, miose, depressão respiratória, euforia e disforia (CLARK et al., 1989; FERRAZ, 1999; TRESCOT et al., 2008).

O receptor ORL-1 está localizado nas fibras aferentes. A orfanina/nociceptina é seu ligante endógeno. O papel fisiológico desse receptor não foi totalmente elucidado, atua na modulação central da dor, na resposta ao estresse, nas emoções, respiração, termorregulação, apetite e regulação do sistema imunológico. Estudos indicam que também atua na plasticidade neuronal (McDONALD; LAMBERT, 2005; TRESCOT et al., 2008).

Os receptores opioides são membros da família de receptores acoplados a proteína G, possuem sete domínios transmembrânicos e seus parentes mais próximos são os receptores somatostatínicos (FERRAZ, 1999; KANE; SVENSSON; FERGUSON,

LAFORGE, 2007; McDONALD; LAMBERT, 2005; TRIGO et al., 2010). A figura 2 resume o mecanismo intracelular de ativação do receptor opioide μ .

Figura -2 Mecanismo intracelular de ativação do receptor opioide μ por compostos agonistas
Fonte Adaptado de KREEK; LAFORGE, (2007).

Cada família de peptídeos opioides é originada de um gene distinto. Estes genes orientam o código de síntese de uma grande proteína precursora a partir da qual vários peptídeos ativos são produzidos. Os peptídeos opioides são classificados em duas categorias: peptídeos opioides típicos e atípicos (GOZZANI, 1994; TESCHEMACHER, 1993).

Os peptídeos opioides típicos incluem as encefalinas, endorfinas e dinorfinas. Esse grupo apresenta na região do N-terminal uma sequência de tetrapeptídeo Tyr-Gly-Gly-Phe, a qual confere a propriedade de ligação com receptores opioides (TRIGO et al., 2010).

As endorfinas são polipeptídeos opioides endógenos com tamanho que varia entre 16 a 31 resíduos de aminoácidos, os quais são derivados do precursor pró-opiomelanocortina. Pesquisas descrevem a existência de quatro tipos de endorfina: a alfa (α), beta (β), gama (γ) e sigma (σ) (KONERU; SATYANARAYANA; RIZWAN, 2009).

A β -endorfina é o peptídeo opioide endógeno mais potente. Ela foi identificada em mais de vinte diferentes partes do corpo e vários compartimentos do sistema nervoso central como: hipófise anterior, lobo intermediário, em núcleos do hipotálamo basal e medial e células do núcleo do trato solitário (centro simpático primário para os arcos reflexos dos baro e quimiorreceptores). A β -endorfina atua no controle da dor, modula a resposta ao estresse e também por ser produzida no sistema límbico participa do controle da ansiedade. Esse peptídeo pode ter um papel na prevenção da obesidade, diabetes e doenças psiquiátricas (GOZZANI, 1994; KONERU; SATYANARAYANA; RIZWAN, 2009).

A pró-enkefalina é precursora das enkefalinas. Cada unidade desse peptídeo produz quatro cópias de Metionina-enkefalina (Met-enkefalina) e uma única cópia de Leucina-enkefalina (Leu-enkefalina). As enkefalinas foram encontradas no sistema nervoso central e na periferia como medula adrenal, trato digestório (especialmente no plexo mientérico), medula espinal, diversas regiões supraespinais do sistema nervoso central, em particular corpos celulares do globo pálido, núcleos supra-ópticos e paraventriculares do hipotálamo, amígdala e neocórtex (AKIL et al., 1984; GOZZANI, 1994).

A pró-dinorfina quando quebrada pela enzima pró-proteína convertase 2 (PC2), produz peptídeos opioides ativos dinorfina A e dinorfina B. Elas foram identificadas no intestino, hipotálamo, hipófise posterior, tronco encefálico e medula espinal. As dinorfinas exercem seus efeitos principalmente sobre os receptores κ e atuam na modulação de resposta a dor, mantém a homeostase, controlam o apetite e peso, como também regulam o ritmo circadiano e temperatura corpórea (GOZZANI, 1994; KONERU; SATYANARAYANA; RIZWAN, 2009).

Os peptídeos opioides endógenos atípicos originam de diversas proteínas precursoras e carregam várias sequências de aminoácidos na região do N-terminal, conservando somente o aminoácido tirosina na posição 1. O tetrapeptídeo dos

peptídeos opióides atípicos apresentam uma sequência mínima para uma plena atividade opioide (JANECKA; FICHNA; JANECKI, 2004).

A orfanina /nociceptina é o ligante endógeno do receptor ORL-1. Ela é derivada do precursor pró-nociceptina. A sequência da orfanina/nociceptina na região do N-terminal varia somente na posição 1, onde o aminoácido fenilalanina substitui a tirosina presente na sequência dos peptídeos opióides típicos (JANECKA; FICHNA; JANECKI, 2004; McDONALD; LAMBERT, 2005).

As endomorfina são dois tetrapeptídeos denominados como endomorfina-1 e endomorfina-2. Elas apresentam elevada afinidade e especificidade para o receptor μ . Até o momento não foi identificado o precursor desses peptídeos (JANECKA; FICHNA; JANECKI, 2004).

A endomorfina-1 está amplamente distribuída no cérebro. É particularmente abundante no núcleo acúmbens, córtex, amígdala, tálamo, hipotálamo, corpo estriado, gânglio da raiz dorsal, núcleo do trato solitário, hipotálamo periventricular e hipotálamo dorsomedial, onde é encontrada dentro dos neurônios histaminérgicos e regulam a sedação e comportamento de excitação (GOLDBERG et al., 1998; KONERU; SATYANARAYANA; RIZWAN, 2009).

Em contraste a endomorfina-2 é mais prevalente na espinha dorsal e tronco encefálico baixo. Ela tem papel importante na percepção da dor, respostas relacionadas ao estresse e funções complexas como da recompensa, excitação e vigília. Esse peptídeo também está relacionado às funções autônomas, cognitivas, neuroendócrina e de homeostase límbica (GOLDBERG et al., 1998; KONERU; SATYANARAYANA; RIZWAN, 2009).

3.5.1.2 Peptídeos opióides derivados de alimentos

Algumas proteínas que estão naturalmente presentes em alimentos exercem funções fisiológicas de forma direta ou indireta após hidrólise *in vivo* ou *in vitro*. Pesquisas indicam que algumas proteínas dietéticas de origem animal (ex. peixe, leite e ovo) e vegetal (ex. espinafre, soja e trigo) apresentam quantidade significativa de

peptídeos biologicamente ativos (HARTMANN; MEISEL, 2007; MÖLLER; SCHOLZ-AHRENS; ROOS, 2008).

Os peptídeos bioativos são definidos como fragmentos de proteínas específicos que tenham um impacto positivo sobre as funções do corpo ou condições e podem vir a influenciar a saúde (KITTS; WEILER, 2003). Esses peptídeos são inativos quando estão ligados à proteína íntegra e podem ser produzidos de três formas: por hidrólise de enzimas digestivas, hidrólise através de microrganismos proteolíticos e hidrólise resultante da ação de enzimas proteolíticas derivadas de microrganismos ou plantas (KORHONEN; PIHLANTO, 2006).

A quebra da proteína induz a formação de diferentes sequências de resíduos de aminoácidos, com tamanho que pode variar de 3 a 20 aminoácidos. A ação bioativa depende da sequência formada durante a hidrólise e podem desempenhar diversas funções: antioxidante, hipocolesterolemica, na bioconservação de íons metálicos (ex. Fe, Ca e Zn), antimicrobiana, antitrombótica, anti-hipertensiva, imunomoduladora e opioide (HARTMANN; MEISEL, 2007; MEISEL, 1998; MÖLLER; SCHOLZ-AHRENS; ROOS, 2008).

Os peptídeos opioides de origem alimentar podem ter ação agonista ou antagonista. Eles são classificados como atípicos, pois a estrutura comum entre os peptídeos opioides típicos endógenos (ex. endorfinas, dinorfinas e encefalinas) e os provenientes de alimentos (ex. leite, glúten, rubisco do espinafre, hemácia e citocromo da mitocôndria bovina) é a presença de tirosina no N-terminal na posição 1 (BRANTL et al., 1979; BRANTL et al., 1985; BRANTL et al., 1986; FUKUDOME; YOSHIKAWA, 1992; HIRATA, et al., 2007; JANECKA; FICHNA; JANECKI, 2004; TESCHEMACHER, 1993).

As exorfinas A (A4 e A5) derivadas do glúten, a conglicina derivada da soja e fragmentos da α_{s1} da caseína são exemplos de exceção, pois o aminoácido glicina, valina e arginina respectivamente substituem a tirosina na posição 1 da região do N-terminal (FUKUDOME; YOSHIKAWA, 1992; HIRATA, et al., 2007; SILVA; MALCATA, 2005).

3.5.1.3 Peptídeos opioides derivados do trigo

O glúten corresponde a 80% do total de proteínas presente nos grãos, é uma mistura de mais de cem polipeptídeos. Ele é composto principalmente por duas proteínas de reserva, as gliadinas (prolaminas) de peso molecular que varia entre 30 a 50 KDa e as gluteninas (glutelíνας) com peso molecular entre 69 a 88KDa (APICHARTSRANGKOON, 2002).

No estudo de Fukudome e Yoshikawa (1992), foram identificados e caracterizados quatro peptídeos opioides nomeados de exorfinas do glúten A5, A4, B5 e B4.

As exorfinas A (A5 e A4) possuem afinidade e especificidade para receptor δ . A sequência da exorfina A5 foi encontrada em 15 sítios da estrutura primária da glutenina. Estudos *in vivo* com animais relatam que a exorfina B5 tem elevada habilidade de modificar a neurotransmissão (FANCIULLI et al., 2007; FUKUDOME; YOSHIKAWA, 1992).

Os peptídeos opioides B (B5 e B4) não foram identificados na estrutura primária da gliadina e glutenina. Apesar dessa constatação não se descarta a possibilidade das exorfinas B serem derivadas das proteínas do glúten, pois é formado por uma mistura complexa de proteínas. O peptídeo B5 é considerado a exorfina de origem alimentar mais potente. Esse fato provavelmente está relacionado à estrutura que é similar a Leu-enkefalina (FUKUDOME; YOSHIKAWA, 1992).

Em 1993 Fukudome e Yoshikawa identificaram a sequência da gluteorfina C a qual, também não foi encontrada na estrutura primária da gliadina ou da glutenina. Esse peptídeo tem ação opioide agonista e especificidade para o receptor opioide δ .

As exorfinas derivadas do glúten são formadas a partir da hidrólise enzimática, durante a digestão no intestino. Quando a permeabilidade intestinal está aumentada, elas possuem a capacidade de atravessar a parede intestinal, entrar na corrente sanguínea, penetrar no sistema nervoso central e atuar como substância opioide. O mecanismo que permite a passagem desses compostos pela barreira hematoencefálica ainda não foi elucidado (FANCIULLI et al., 2007).

3.5.1.4 Peptídeos opioides derivados do leite

As proteínas do leite compreendem duas frações: as caseínas que compõe 80% do total de proteína presente no leite bovino, principalmente na forma de partículas coloidais (micelas) e proteínas do soro que correspondem aos 20% restantes em estado de solução (SGARBIERI, 1996).

A caseína é formada por três principais componentes: α_{s1} (53% do total), β (33%) e κ (15%), existindo ainda quantidades variáveis do componente γ . As duas principais proteínas do soro, a α -lactalbumina, β -lactoglobulina, perfazem 70-80% do total. Além dessas são encontradas as soralbuminas, imunoglobulinas, proteose-peptonas, lactoferrinas, transferrinas e enzimas (SGARBIERI, 1996).

O leite e seus derivados são fontes dietéticas de peptídeos opioides, os quais estão presentes em estruturas primárias das diversas proteínas do leite. A β -casomorfina (1-7) e β -casomorfina (1-5) foram os primeiros peptídeos opioides derivados de alimentos identificados por Brantl e colaboradores em 1979.

O maior peptídeo opioide de origem dietética é o fragmento 60-70 da β -caseína (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu) caracterizado por ter elevada afinidade pelo receptor μ . Após a descoberta das β -casomorfina vários análogos foram isolados no leite humano, de ovelha e búfala (MEISEL, 1998).

Os peptídeos opioides são dotados de ação farmacológica agonista semelhante aos compostos opioides (com exceção do naloxone que possui ação antagonista), foram isolados na estrutura primária das frações β , α_s e γ da caseína como também na α -lactalbumina, β -lactoglobulina e soralbumina presentes no soro do leite bovino. Esses compostos podem induzir a apneia e respiração irregular, modulação do padrão do sono, estimular a produção de insulina e somatostatina, prolongar o tempo do trânsito intestinal, inibir a diarreia, estimular a absorção de água e eletrólitos e modular o transporte intestinal de aminoácidos. Além disso, podem produzir analgesia e alterar o comportamento social (HARTMANN; MEISEL, 2007; SHAHIDI; ZHONG, 2008; SILVA; MALCATA, 2005).

Existem peptídeos opioides derivados do leite com ação antagonista. Eles são denominados de casoxinas (A, B, C e D) e estão presentes nas frações κ , α_{s1} da

caseína. Na lactoferrina do leite humano foi identificado o peptídeo opioide nomeado de lactoferroxina (MEISEL, 1998; SILVA; MALCATA, 2005).

As β -casomorfina são formadas durante a digestão por ação das enzimas proteases. A sua absorção pelo intestino ainda não está bem esclarecida, em recém-nascidos ocorre por via transporte passivo (SILVA; MALCATA, 2005).

Estudos sobre imunorreatividade das β -casomorfina, os quais tiveram como objetivo identificar essas exorfinas no sangue após a ingestão de leite, falharam na detecção em humanos adultos (SUN et al., 2003).

Apesar dos resultados negativos não se pode descartar o fato de que os produtos derivados de alimentos podem ser absorvidos por subgrupos de indivíduos adultos ou por pessoas com patologias que alteram a permeabilidade da parede intestinal. Foram identificados níveis elevados de β -casomorfina na urina e sangue de indivíduos com doença celíaca, autismo, esquizofrenia, depressão e psicose pós-parto, indicando claramente que esses peptídeos bioativos podem atravessar a parede intestinal em quantidades significativas (SEIM; REICHEL, 1995; SUN et al., 2003).

Os peptídeos derivados da caseína possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, mas até o momento o mecanismo envolvido não foi totalmente elucidado.

Segundo Banks e Kastin (1984), os peptídeos podem ser transportados através da barreira hematoencefálica pelo sistema de transporte saturável. Esse sistema é caracterizado por elevada seletividade por peptídeos que apresentam na região do N-terminal o aminoácido tirosina. Nesse grupo de peptídeos incluem-se, as encefalinas, dinorfinas e β -casomorfina.

3.5.1.5 Teoria do excesso de peptídeos opioides e autismo

As primeiras evidências de que o excesso de opioides poderia mudar o comportamento de autistas foram descritas nas pesquisas de Panksepp (PANKSEPP et al., 1978; PANKSEPP, 1979).

Em seu primeiro trabalho, utilizando modelo animal, concluiu que o excesso de casomorfina induz ao comportamento de apatia e isolamento social.

Na pesquisa posterior observou que animais jovens, expostos a drogas opioides, desenvolveram comportamento semelhante ao observado em crianças autistas.

A partir desses resultados Panksepp postulou a teoria de que a síndrome autística é resultante da sobrecarga do sistema opioide (PANKSEPP, 1979).

Outros resultados de trabalhos reforçaram a teoria de Panksepp (1979). Em 1985 Gillberg e colaboradores identificaram hiperatividade dos receptores opioides em autistas.

Estudos experimentais descreveram possíveis mecanismos de ação. A administração de substâncias opioides em ratos na fase tardia do desenvolvimento altera o tamanho de estruturas específicas do cérebro relacionadas ao comportamento. Esta característica é comumente observada em exames de ressonância magnética do cérebro de autistas. Também foi observado que opioides sintéticos e as β -casomorfina induzem a ataques epiléticos, especialmente na região do córtex temporal. A prevalência de epilepsia é maior em autistas quando comparado a indivíduos saudáveis (REICHELDT; KNIVSBERG, 2009).

Dohan (1980) foi o primeiro estudioso a levantar a hipótese de que peptídeos opioides derivados do trigo e do leite estariam associados à etiologia da esquizofrenia. Posteriormente grupos de pesquisa identificaram similaridade entre o comportamento de esquizofrênicos e autistas.

Essas constatações deram início a várias investigações com o objetivo de compreender estes fatos e concluíram que a teoria de Dohan (1980) também se aplicava à síndrome do espectro autista.

Estudos experimentais descreveram alteração de comportamento de animais e disfunções de áreas do cérebro após sobrecarga de peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína.

No trabalho de Hemmings (1978), por via oral foram administrados fragmentos de glúten a ratos brancos. Após um determinado tempo foi detectada a presença de exorfinas derivadas do glúten no cérebro dos animais.

Sun et al. (1999) estudaram o efeito da β -casomorfina (1-7) no cérebro de ratos. Eles observaram que após infusão via endovenosa do peptídeo os genes (c- Fos) em várias regiões do cérebro foram ativados de forma imediata, indicando que a exorfina teve acesso ao sistema nervoso central e que também alterou a atividade das células cerebrais. As áreas conhecidas, por serem locais que dão origem ou fornecem componentes aos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e GABAérgico também foram ativadas. Essas áreas estão relacionadas com o sistema opioide, pois ele regula a atividade das mesmas.

Sun e Cad (1999) em estudo posterior observaram o comportamento de ratos após a infusão endovenosa de β -casomorfina (1-7). Os animais manifestaram comportamento semelhante ao de autistas.

Hole et al. (1979), injetaram peptídeos opioides isolados de urina humana em ratos. O comportamento dos animais também foi similar ao de autistas.

Estes achados confirmam a capacidade das exorfinas derivadas do leite e trigo de atravessarem a barreira hematoencefálica e afetarem a transmissão de impulsos nervosos do cérebro. A longa duração do efeito destes compostos no sistema nervoso central deve-se a sua grande estabilidade e resistência a enzimas proteases (WHITE, 2003).

A ação psicotrópica dos resíduos de casomorfina foi confirmada com as pesquisas de Nyberg et al. (1989) e Lindistrøm et al. (1984) que identificaram β -casomorfina (1-8) e outros resíduos no fluido cefalorraquidiano de gestantes e lactantes que apresentavam quadro de psicose.

Alguns sintomas característicos da síndrome como analgesia, alterações na percepção de ruídos e gosto e a inadequação do sistema vestibular caracterizado por movimentos repetitivos de girar ou balançar a cabeça podem ser explicados por alterações de neurotransmissão devido ao excesso de substâncias opioides no cérebro (REICHEL; KNIVSBERG, 2009).

3.5.1.6 Mecanismos envolvidos na teoria de sobrecarga de peptídeos opioides

Os estudos experimentais conseguiram evidenciar a ação dos peptídeos opioides sobre o sistema nervoso central de autistas, mas até presente data o mecanismo de ação não é totalmente conhecido. A análise dos resultados de diversas pesquisas permite a conclusão de que o aumento da permeabilidade intestinal, a redução da produção de proteases e alterações da resposta imunológica estejam envolvidos.

3.5.1.7 Aumento da permeabilidade intestinal

O aumento da permeabilidade intestinal permite a passagem do lúmen do intestino para a corrente sanguínea de compostos que podem ser prejudiciais ao sistema nervoso central como as toxinas de bactérias presentes na flora intestinal e substâncias que tem afinidade por receptores do sistema nervoso central (VALICENTI-McDERMOTT et al., 2008; WHITE, 2003).

As anormalidades do trato digestório de autistas frequentemente descritas em artigos como: processos inflamatórios do intestino, elevada colonização de bactérias do gênero *Clostridium*, sensibilidade á alimentos e defeito no mecanismo de sulfatação contribuem para aumento da permeabilidade da mucosa intestinal (CHRISTISON; IVANY, 2006; WHITE, 2003).

Goodwin, Cowen e Goodwin (1971), avaliaram a permeabilidade intestinal de crianças autistas com sintomas gastrointestinais (diarreia, intolerância alimentar e cólica). As crianças foram expostas à dose oral de um grama de gliadina e dose oral de um grama de açúcar. Após a ingestão de cada composto foi realizado o teste de mensuração do potencial de corrente direta transcefálica (TDC). O resultado revelou que as crianças autistas apresentaram redução significativa da voltagem frontal após consumo da gliadina, quando comparada à reposta do consumo de açúcar. Nesta pesquisa crianças com desenvolvimento típico ou limítrofe para o autismo não manifestaram alteração da resposta após o consumo de gliadina. Esse resultado

confirma a teoria de que patologias do trato digestório podem aumentar a permeabilidade intestinal de crianças autistas.

Alguns pesquisadores acreditam que a elevada permeabilidade da parede intestinal de autistas seja uma condição intrínseca do transtorno e que não está associada às patologias do trato digestório (WHITE, 2003).

D' Eufemia et al. (1996) aplicaram o teste de permeabilidade intestinal em 21 pacientes autistas com idade entre 4 e 16 anos e que não manifestavam doenças do trato digestório e compararam com grupo de 40 crianças saudáveis da mesma faixa etária. Eles concluíram que crianças autistas apresentaram maior permeabilidade intestinal do que crianças com desenvolvimento típico e que o aumento da permeabilidade intestinal não está relacionado a alterações do trato digestório.

3.5.1.8 Alterações na produção de enzimas em autistas

Pesquisas que analisaram urina, sangue e fluido cerebrospinal de crianças autistas, constataram a presença de níveis elevados de peptídeos opioides provenientes da caseína e do glúten (SHANAHAN et al., 2000).

Reichelt et al. (1991) analisaram amostras de urina de crianças autistas e constataram a presença de β -casomorfina (1-7).

Foram identificadas na urina de crianças autistas além das casomorfina outras moléculas com ação semelhante. A deltorfina peptídeo modulador da endorfina e dermorfina também foi identificado (SHANAHAN et al., 2000).

Winsberg e colaboradores (1980) encontraram elevada concentração de aminoácidos no líquido cerebrospinal de crianças autistas, sugerindo a existência de anormalidade do metabolismo monoamínico de alguns autistas.

Os resíduos de aminoácidos derivados da dieta encontrados nos líquidos corpóreos de autistas têm em comum uma estrutura rica em prolina. Esse fato levou a conclusão de que a enzima que provavelmente é deficitária em autistas é a dipeptidil peptidase IV (DPPIV) (SHANAHAN et al., 2000; SUN et al., 2003).

Ela é uma aminopeptidase com alta especificidade que se expressa em diferentes células em várias espécies de mamíferos. Foi identificada no mecônio, placenta e glândulas exócrinas. Encontra-se na superfície celular de tecidos envolvidos na mobilização de grandes peptídeos como os que estão na borda em escova do intestino, nas membranas caniculares de formação da bile no fígado e do córtex renal. Ela também está presente na superfície de células T-helper e outras de origem hematopoiética, neste caso são chamadas de CD26. No sangue são encontradas na forma solúvel SCD26 (JARMOŁOWSKA et al., 2007; SUN et al., 2003).

Esta enzima é crucial para a hidrólise de peptídeos compostos por cadeias longas e que possuem na penúltima posição do N-terminal o aminoácido prolina ou alanina em dipeptídeos para serem transportados pela parede intestinal. Ela também desempenha funções de modificação, processamento e/ou inativação de peptídeos com função hormonal, citocinas, neuropeptídeos, fatores de crescimento entre outros compostos (JARMOŁOWSKA et al., 2007).

Apesar das evidências o mecanismo de ação não está totalmente elucidado. Sugere-se que outras proteases também sejam deficientes como a propileno peptidase, a prolil endopeptidase e enzima de clivagem pós-prolina. A função principal de todas essas enzimas é a quebra do aminoácido prolina (TESCHEMACHER, 1993).

O excesso de peptídeos opioides circulantes devido à deficiência enzimática pode desencadear ação no sistema nervoso central e também em outros sistemas. Esses peptídeos foram identificados no lúmen intestinal de humanos e animais após consumo de leite e trigo. Eles possuem habilidade de atravessar a parede intestinal por vias alternativas entre os enterócitos e alcançar a corrente sanguínea. Pesquisas comprovaram a presença de peptídeos opioides na circulação portal e fígado de animais (porcos da índia, ratos, bezerros e coelhos) como também na circulação sistêmica de humanos (SEIM; REICHEL, 1995).

As exorfinas derivadas do glúten e da caseína podem estimular o sistema linfático. Esses compostos quando reconhecidos como antígenos no lúmen, são capturados por células M e transportados para as células dendríticas para o processamento do antígeno e sensibilização das células T e B das placas de Peyer. As células B presentes nos nódulos linfáticos respondem a presença de antígenos providos

da dieta, secretando anticorpos e imunoglobulinas (SEIM; REICHEL, 1995; WHITE, 2003).

O tecido da mama possui elevada permeabilidade para as β -casomorfina e fragmentos da gliadina. Estudos identificaram esses peptídeos no leite humano em diferentes etapas da lactação (STUART et al., 1984; TRONCONE et al., 1987).

Quantidade significativa de exorfinas circulante pode atravessar a barreira hematoencefálica e modificar a neurotransmissão. Estudos relatam alteração do comportamento de ratos após injeção endovenosa de peptídeos derivados de alimentos. Outra evidência é a identificação de elevada concentração de β -casomorfina (1-7) e β -casomorfina (1-8) no líquido cefalorraquidiano de lactantes que manifestavam quadro de psicose pós-parto (LINDISTRØM et al., 1984; NYBERG et al., 1989; HOLE et al., 1979).

O excesso de peptídeos opioides circulantes é excretado pela urina. Pesquisas identificaram em indivíduos com doenças psiquiátricas (autismo, esquizofrenia, psicose pós-parto e depressão) nas quais, sua etiologia está relacionada à deficiência enzimática, elevada concentração de peptídeos opioides de origem dietética na urina (SEIM; REICHEL, 1995). A ação sistêmica dos peptídeos opioides provenientes da deficiência enzimática está resumida na figura 3.

Figura 3 - Ação sistêmica dos peptídeos opioides derivados de alimentos
Fonte Adaptado de SEIM; REICHEL, (1995).

3.5.1.9 Alterações do sistema imunológico

Alguns estudos relatam condições médicas que ocorrem com frequência em crianças autistas. Dentro dessa classe se inclui infecção de ouvido, infecção respiratória superior, reações adversas a múltiplos medicamentos e período prolongado do curso (ciclo de desenvolvimento da patologia) de doenças quando comparado a crianças com desenvolvimento normal. Em um subgrupo de autistas, existe a elevada ocorrência de doenças autoimune em membros da família (COMI et al., 1999).

Pesquisas descrevem elevada prevalência de imunopatologias no trato digestório em crianças autistas como hiperplasia nodular linfoide na região íleo-colônica, panenterite e quadro de inflamação intestinal não específica (ASHWOOD, et al., 2003; TORRENTE et al., 2002).

Existem evidências de que alterações do sistema imunológico afetam vários autistas. Foi identificado em crianças autistas nível elevado do antagonista dos receptores de interleucina 1 (IL-1RA), o que indica um aumento da resposta celular de macrófagos. Estudos revelaram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) em células mononucleares do sangue periférico de crianças autistas, com ou sem estimulação por lipopolissacarídeos (LPS) (PARDO-GOVEA; SOLÍS-ÁÑE, 2009).

Pesquisas descreveram elevados níveis séricos de IgE, IgG e autoanticorpos contra células neuronais em autistas. Atualmente a maior evidência imunológica, sugere um desequilíbrio no padrão de secreção de Th1 e Th2 por parte dos linfócitos T CD4+, caracterizado pelo predomínio de citocinas Th2 em indivíduos com transtorno do comportamento (PARDO-GOVEA; SOLÍS-ÁÑE, 2009).

A elevada frequência de patologias alérgicas em autistas pode ser atribuída aos fatores genéticos. Estudos descreveram alta prevalência de doenças relacionadas ao sistema imune em mães de autistas. O estudo de Croen et al. (2005), descreveu que 40,6% das mães de crianças autistas investigadas manifestavam resposta alérgica como asma, rinite e alergias diversas. Os pesquisadores hipotetizaram que a resposta imunológica materna durante a gestação, pode afetar o desenvolvimento cerebral fetal,

contribuindo assim, para o desenvolvimento do autismo em indivíduos geneticamente susceptíveis.

Dalton et al. (2003) observaram que o soro de mães de autistas, quando injetados em ratas prenhes produz anticorpos com afinidade para células de Purkinje dos fetos.

O glúten, a caseína e os peptídeos derivados dessas proteínas podem estimular a produção de linfócitos T-helper, citocinas inflamatórias e desencadear respostas inflamatórias, reações autoimunes e rompimento da comunicação neuroimune (JYONOUCHI; SUN; LE, 2001).

Vojdani e colaboradores (2002) identificaram anticorpos IgM, IgG e IgA para nove antígenos específicos de neurônios no soro de crianças autistas. Esses anticorpos foram identificados, ligados a diferentes moléculas encefalitogênicas que possuem sequência homóloga a proteína do leite.

Lucarelli e colaboradores (1995) observaram respostas imunológicas anormais. Eles identificaram em crianças autistas níveis elevados de IgA, IgG e IgM após o consumo de leite e derivados.

No estudo de El-Hodhod et al. (2006), foi observada maior concentração de IgE específico para leite de vaca no soro de crianças autistas quando comparado com crianças normais.

Jyonouchi, Sun e Itokazu (2002) identificaram uma relação positiva entre sintomas gastrointestinais e manifestações alérgicas. Os pesquisadores observaram que uma dieta isenta de leite e trigo reduz os sintomas gástricos e melhora o quadro clínico de autistas. Eles postularam que autistas podem ser alérgicos a proteínas da dieta, que induz a inflamação intestinal e agravamento de alguns sintomas comportamentais.

Em estudo posterior o mesmo grupo de pesquisadores confirmou a hipótese anterior e concluíram que sintomas gastrointestinais e comportamentais podem ser mediados por anormalidades da resposta imune inata (JYONOUCHI et al., 2005).

Os anticorpos da gliadina e da caseína podem desencadear reações cruzadas com os antígenos do sistema nervoso central conduzindo a uma reação autoimune que

tem como consequência disfunção neuronal que intensificam o comportamento característico da síndrome.

Na pesquisa de Vojdani e colaboradores (2004a), os resultados indicaram a existência de um subgrupo de autistas que produz anticorpos que atuam sobre peptídeos da gliadina e células de Purkinje.

O resultado dessa pesquisa associado aos de trabalhos anteriores levou esse grupo de estudiosos a propor um mecanismo de ação envolvido na resposta imunológica cruzada. Segundo essa hipótese as proteínas da dieta se ligam a receptores de linfócitos e enzimas de tecidos como a dipeptidil peptidase IV (CD26), dipeptidil peptidase I (DPPI), aminopeptidase N (CD13) e marcadores de ativação de linfócitos (CD69). Essa reação induz a produção de anticorpos para as proteínas da dieta e antígenos de tecidos. A produção de autoanticorpos e disfunção de enzimas presentes em membranas podem resultar em desregulação neuroimune e reação autoimune. Para os autores a reação cruzada ocorre em indivíduos com predisposição dos antígenos leucocitários humanos (HLA) (VOJDANI et al., 2004a; VOJDANI et al., 2004b).

Em pesquisa genética, estudos continuam a busca por mutações associadas com a imunidade e que possam afetar a incidência de indução de alergia em autistas. Existe um estudo no qual, foi identificado o alelo nulo de C4B em 42% de crianças autistas. Esse genótipo predispõe o desenvolvimento de doenças autoimune e alergia alimentar que ocorrem frequentemente em famílias de pais de autistas (ODELL et al., 2005).

3.5.1.10 Síntese da hipótese

Na atualidade a teoria aceita é de que as deficiências de enzimas proteases principalmente daquelas que clivam o aminoácido prolina, conduzem à produção excessiva de peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína dentro do lúmen intestinal. Relacionado a este fato o aumento da permeabilidade da parede intestinal causada por diversas condições patológicas permite a passagem dos peptídeos

opioides para a corrente sanguínea. Estes compostos ultrapassam a barreira hematoencefálica do cérebro e por terem afinidade com os receptores opioides conduzem à sobrecarga do sistema opioide. Associado as condições descritas as reações imunológicas, devido à sobrecarga de peptídeos opioides, também contribuem para o agravamento dos sintomas comportamentais. (REICHELT; KNVISBERG, 2003; WHITE, 2003). A figura 4 ilustra a relação entre os mecanismos associados à teoria de sobrecarga de peptídeos opioides.

Figura 4 - Relação entre os mecanismos associados à teoria de sobrecarga de peptídeos opioides
Fonte imagem: www.google.com.br

Alguns trabalhos relatam a associação de uma dieta isenta de caseína com o progresso da conduta social, desenvolvimento cognitivo e comunicação de autistas. Na pesquisa de Lucarelli et al. (1995), realizada com 36 crianças autistas, foi registrada a progressão da Escala Subjetiva de comportamento de 5 para 7, ou seja, melhora do comportamento das mesmas, após 8 semanas de adesão à dieta isenta de leite de vaca.

Em um estudo a eficácia de uma dieta isenta de caseína e glúten foi pesquisada. Nesse estudo 20 autistas com níveis anormais de peptídeos opioides na urina foram

observados. Os participantes foram divididos em dois grupos onde 10 autistas consumiram uma dieta isenta de glúten e caseína e o outro grupo participou como controle pelo período de um ano. Os resultados indicaram significativa melhora dos sintomas dos autistas do grupo que consumiu a dieta isenta de caseína e glúten, quando comparado ao grupo controle (KNIVSBERG; REICHELTE; HØIEN, 2002).

Whiteley et al. (2010), avaliaram a eficácia de uma dieta isenta de caseína e glúten. Participaram desse estudo 72 crianças autistas na faixa etária de 4 a 10 anos onde foram observados na urina dessas crianças níveis anormais de peptídeos ou *trans*-indolil-3-acrililglicina (IAG). Os participantes foram divididos em dois grupos onde 38 autistas consumiram dieta isenta de glúten e caseína e o outro grupo com 34 crianças que consumiram uma dieta controle por um período de dois anos.

Os resultados indicaram significativa melhora do déficit de atenção e hiperatividade dos autistas que consumiram a dieta isenta de glúten e caseína quando comparado ao controle.

3.5.1.11 Biomarcadores

Os estudos que comprovam esta hipótese sofrem críticas que apontam para algumas questões, mas a mais importante é que na maioria deles a eficácia da dieta é avaliada por testes psicológicos. Esses métodos são subjetivos, o que torna os resultados não confiáveis (MULLOY et al., 2010).

Algumas pesquisas sugerem a urina como possível biomarcador para identificação de produção excessiva de peptídeos opioides de origem dietética.

Böhlen et al. (1980) foram os primeiros a utilizarem o método de cromatografia líquida para o isolamento dos peptídeos presentes em urina. Eles propuseram a separação de peptídeos dos aminoácidos e sais através do uso de colunas C-18 de fase reversa.

Reichelt e colaboradores (1997) identificaram o perfil de peptídeos presente na urina de crianças autistas de sete países, e o efeito da intervenção na dieta foram determinados por cromatografia líquida de fase reversa (HPLC).

O mesmo grupo de pesquisadores utilizando a metodologia definida anteriormente, identificou e quantificou de forma indireta peptídeos opioides de origem alimentar na urina de portadores de doença celíaca, Síndrome de Rett e depressão (REICHELT et al., 1998; SOLAAS et al., 2002; LIU; HEIBERG; REICHELT, 2007).

Apesar dos resultados promissores os métodos encontrados em literatura não são possíveis de replicação. Os estudos de Cass et al. (2008), Hunter et al. (2003) e outros pesquisadores não reproduziram os mesmos resultados sendo assim, necessárias novas pesquisas para desenvolver um método seguro e replicável.

3.5.2 Alterações do metabolismo da creatina

A creatina (ácido α -metilguanidinoacético) é um composto aminoacídico atípico encontrado naturalmente nos alimentos principalmente nas carnes e nos peixes. Em humanos, 95% da creatina total são encontradas no músculo esquelético. Os 5% restantes se distribuem entre o encéfalo, fígado, rins e testículo. Ela é conhecida por ter um papel importante na transmissão e estoque de energia nas células e tecidos com elevada demanda de energia (VERHOEVEN; SALOMONS; JAKOBS, 2005; WHITELEY et al., 2006).

Para manter o “pool” de creatina, o corpo utiliza dois mecanismos: consumo de alimentos e síntese endógena. A biossíntese requer a ação de duas enzimas: L-arginina: glicina amidinotransferase (AGAT; EC 2.1.4.1) e a guanidinoacetato N-metiltransferase (GANT, EC 2.1.1.2) (VERHOEVEN; SALOMONS; JAKOBS, 2005).

A produção endógena inicia nos rins. O primeiro passo envolve a transferência do grupo amidino da arginina para a glicina a fim de formar ácido guanidinoacético e ornitina catalisada pela enzima AGAT (EC 2.1.4.1). O ácido guanidinoacético é transportado da corrente sanguínea para o fígado. Em seguida ocorre a transferência, irreversível, de um grupo metila da metionina através da S-adenosilmetionina para o ácido guanidinoacético, reação catalisada pela GAMT(EC 2.1.1.2). O produto final dessa etapa é a creatina (VERHOEVEN; SALOMONS; JAKOBS, 2005). A figura 5 ilustra a produção endógena de creatina.

Figura 5 -Produção endógena de creatina
 Fonte Adaptado de VERHOEVEN; SALOMONS; JAKOBS, (2005).

A creatinina é um metabólito nitrogenado resultante do metabolismo da creatina. Atualmente as concentrações de creatinina em diferentes fluidos corpóreos como o sangue e urina podem confirmar importantes informações fisiológicas. Ela é parte do mecanismo da homeostase renal e sua concentração em urina e plasma pode dar indicações sobre o funcionamento dos rins (WHITELEY et al., 2006).

Além dessa função atualmente está sendo utilizada como um dos biomarcadores que auxiliam no diagnóstico de disfunções relacionadas a biossíntese e transporte de creatina. Na literatura tem se relatado de que a urina de crianças autistas apresenta baixas concentrações de creatinina. O mecanismo de ação que explica esse fenótipo ainda não foi elucidado (WHITELEY et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado estudo de caso-controle de uma população de 28 autistas com grupo controle formado por parentes do mesmo sexo com desenvolvimento normal.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Humanos da Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” CEP/ESALQ-USP em 19 de novembro de 2008 (nº protocolo do processo 19).

Ele também foi aprovado pelo Comitê de Ética Ambiental em Pesquisa da Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” CEP/ESALQ-USP em 14 de dezembro de 2009 (nº protocolo do processo 63).

4.1 Triagem dos participantes

A triagem dos autistas foi realizada no Centro Municipal de Especialização do Autista (CEMA) da cidade de Limeira (SP) e no Núcleo de Especialização e Socialização do Autista (NESA) da cidade de Mogi-Guaçu (SP). Os participantes estavam incluídos no programa de tratamento psicopedagógico para autistas, metodologia denominada como Comunicação Alternativa que consiste na previsibilidade do dia e orientações visuais, feitas através de objetos concretos, figuras padronizadas ou cartões escritos.

4.1.1 Recrutamento de participantes

Os pais e responsáveis legais dos autistas receberam convite para que os portadores da síndrome autística que estavam sob sua responsabilidade participassem da pesquisa. Também foi convidado o parente do mesmo sexo do autista para participar do estudo no grupo controle. A participação dos sujeitos da pesquisa foi voluntária.

Os responsáveis legais dos autistas e os parentes participantes do grupo controle assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo A e anexo B) onde estavam expostas as informações sobre o projeto e a participação dos voluntários.

4.1.2 Critério de inclusão e exclusão dos autistas na pesquisa

O critério de inclusão foi o vínculo dos autistas com as instituições participantes. Ele permitiu o controle de duas variáveis. A primeira de que todos os autistas seriam diagnosticados com os mesmos critérios e a segunda que os métodos de tratamento psicopedagógico das clínicas participantes eram semelhantes. Esse fato é positivo para a pesquisa, uma vez que, esse tipo de intervenção exerce grande influência sobre o quadro clínico.

Os critérios de exclusão aplicados aos autistas foram: não participar do tratamento das instituições citadas, serem adeptos de qualquer intervenção nutricional, portadores de doença celíaca e ter patologia diagnosticada que comprometesse o metabolismo proteico como doenças hepáticas e renais.

4.1.3 Critério de inclusão e exclusão dos participantes do grupo controle

O critério de inclusão foi ser parente do mesmo sexo do autista participante.

Os critérios de exclusão aplicados ao grupo controle foram: ser adepto de qualquer intervenção nutricional, portador de doença celíaca e ter patologia diagnosticada que comprometesse o metabolismo proteico como doenças hepáticas e renais.

4.1.4 Caracterização da população

O grupo de autista foi constituído por 28 participantes com faixa etária entre 2 a 33 anos, sendo 20 do sexo masculino e 8 do sexo feminino. Todos foram diagnosticados segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais da Academia Americana de Psiquiatria DSM-IV-TR (APA, 2003) ou de acordo com a Classificação Internacional de Doenças CID-10 (WHO, 1992). O grupo controle foi composto por parentes do mesmo sexo com faixa etária entre 21 a 50 anos.

4.2 Avaliação psicológica

O diagnóstico do quadro clínico atual dos participantes foi realizado pelo método CARS (Childhood Autism Rating Scale) (SCHOPLER; REICHLER; RENNER, 1998) com escala de escore adaptada. Esse instrumento consiste em um questionário com 15 questões que permite fazer avaliação comportamental por observação clínica e expressar em escala numérica a intensidade de sintomas característicos da síndrome do espectro autista como resistência à comunicação, resistência à interação social e principalmente uma avaliação global do quadro clínico. A escala original é dividida em não-autista (15 a 29 pontos), levemente-moderadamente autista (30 a 36 pontos) e severamente autista (37 a 60 pontos).

Para o estudo foi necessário adaptar a escala de escore. Alguns autistas depois de serem avaliados pontuaram valores iguais ou inferiores a 29, sendo considerados pelo método como não autista. A explicação é de que esses indivíduos são casos leves em que os sintomas são pouco intensos. A escala do estudo contém uma nova classe. Indivíduo não autista (15 a 20 pontos), levemente autista (21 a 29 pontos), moderadamente autista (30 a 36 pontos) e severamente autista (37 a 60 pontos). A avaliação foi feita em Mogi-Guaçu pela psicóloga responsável pela instituição Sr^a. Karine Helena Rodrigues Carvalho e em Limeira pela psicóloga Sr^a. Vera Lígia Alves Leite e fonoaudióloga Sr^a. Márcia Regina Cermaria as quais, trabalham na instituição participante. O diagnóstico de presença e ausência de retardo mental foi realizado

através de levantamento de avaliação clínica existente feita pela equipe multidisciplinar das instituições.

4.3 Anamnese nutricional

A anamnese nutricional foi constituída por um questionário contendo perguntas sobre dados sócio-demográficos, histórico pessoal de doenças, hábito alimentar e comportamentos inadequados durante as refeições.

4.3.1 Dados sócio-demográficos

O levantamento dos dados sócio-demográficos permite conhecer características da população que podem influenciar os resultados e também orientar estudos futuros com os mesmos voluntários. Para esse estudo foram levantadas informações sobre escolaridade dos pais dos autistas e renda familiar.

4.3.2 Histórico pessoal de doenças

O conhecimento do histórico pessoal de doenças possibilita identificar patologias relacionadas à condição estudada. Nele também é possível conhecer os medicamentos consumidos.

4.3.3 Comportamento inadequado durante as refeições

A identificação de comportamentos inadequados durante as refeições fornece informações sobre fatores que podem influenciar o consumo de alimentos e de nutrientes.

4.3.4 Levantamento de hábito alimentar

O levantamento de hábito alimentar foi feito por recordatório de 24 horas associado a questionário de frequência de consumo de alimentos.

O recordatório de 24 horas é um instrumento consagrado utilizado para estimar nutriente ou grupos de alimentos. Ele permite flexibilidade na análise de dados, podendo ser feita a avaliação por nutriente, tipo de alimento, grupos de alimentos e por refeições. O recordatório é indicado para estudo de população com baixo nível de escolaridade e também possibilita uma resposta mais ampla favorecendo a comunicação entre o entrevistado e o entrevistador (FIESBERG et al., 2005).

O questionário de frequência de consumo de alimentos é indicado nos estudos de associação entre ingestão dietética e risco de doença e também nas análises de tendências de risco de doenças, segundo o grau de exposição do alimento e ou/ nutriente investigado. Ele oferece informações de consumo habitual de alimentos ou grupo de alimentos. A utilização desse instrumento é indicada para estudos onde a relação de casualidade é forte e também quando o nutriente estudado tem mais de um alimento fonte e particularmente quando as fontes se apresentam de maneiras diferentes (FIESBERG et al., 2005).

Para quantificar o consumo de nutrientes foi utilizado o programa DietWin clínico versão 3.0 DietWin.

A estimativa de óleo incorporado nas preparações foi baseada no artigo de Amorim, Junqueira e Jokl (2010).

O cálculo de adequação de macronutrientes e micronutrientes utilizou como referência a Ingestão Diária Recomendada (IDRs) proposta pelo Institute of Medicine dos Estados Unidos em conjunto com Health Canada Agency (2001).

O cálculo de adequação de consumo de energia utilizou como padrão a recomendação do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (2005).

4.4 Registro fotográfico de comportamento inadequado dos autistas durante as refeições

O registro fotográfico de comportamento inadequado dos autistas durante as refeições foi realizado na clínica da cidade de Limeira. Os pais dos autistas fotografados assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específico (anexo C). Para o registro das imagens foi utilizada a máquina fotográfica digital HP modelo Photosmart M425.

O registro fotográfico é uma atividade comum na área da psicologia tanto na prática clínica como em pesquisa. Na pesquisa permite o registro de determinada ocorrência para tornar-se um dado de estudo, para análise específica do “motivo fotográfico”, isto é, da ação, pessoa ou objeto fotografado. Neste caso, o que importa é apenas o conteúdo presente em cada uma das fotos ou no conjunto delas. Ele permite maior reflexão e conhecimento do comportamento (NEIVA-SILVA; KOLLER, 2002).

4.5 Análise da concentração de creatinina

Os responsáveis pelos autistas e os voluntários do grupo controle receberam orientação, antes da coleta das amostras e tiveram reforço da técnica adequada na véspera do dia da coleta. As orientações foram passadas pelos pesquisadores, responsáveis técnicos das clínicas e coordenadores das mesmas.

A primeira urina do dia dos autistas e dos indivíduos do grupo controle foi coletada e acondicionada em coletor universal. Na cidade de Limeira (SP) a coleta foi a domicílio. A pesquisadora passou nas casas dos participantes para recolher as amostras. O transporte das amostras de urina até o laboratório de Nutrição Humana da ESALQ foi feito utilizando caixa térmica com gelo seco. Em seguida essas amostras foram armazenadas a temperatura de -18°C.

A coleta de urina na cidade de Mogi-Guaçu (SP) também foi realizada em domicílio, mas devido à dificuldade da pesquisadora encontrar as casas, os participantes, levaram as amostras até a clínica. O transporte foi realizado em recipiente

de isopor com gelo. A pesquisadora recolheu as amostras na clínica. O transporte até o laboratório de Nutrição Humana da ESALQ foi semelhante ao da cidade de Limeira (SP).

Posteriormente as amostras foram descongeladas de forma lenta em temperatura média de 2°C, uma porção de 2mL de cada amostra foi separada para análise de concentração de creatinina. A concentração de creatinina foi determinada por método colorimétrico de Jaffé.

O princípio da reação do método de Jaffé é de que a creatinina contida na urina reage com o ácido pícrico em meio alcalino formando complexos de coloração vermelho amarelado com um máximo de absorbância em 510 nm.

O restante da amostra teve volume e pH aferidos. Em seguida foram centrifugados, filtrados, liofilizados e armazenados sob temperatura de -18°C para serem utilizados na análise de identificação e quantificação de peptídeos opioides por cromatografia líquida de alta performance.

4.6 Padronização de método para cromatografia líquida de alta performance

A urina de três voluntários não portadores da síndrome do espectro autista foi coletada. Elas foram centrifugadas (centrífuga Eppendorf 5804R) a 4000g, em temperatura de 4°C por 10 minutos. Após a separação da urina límpida do sobrenadante sólido, foi filtrada em filtro de seringa Milipore Millex, com membrana em PVDF (Fluoreto de polivinilideno) de 0.22µm e aferido o pH e volume final.

Elas foram congeladas a -18°C e liofilizadas (liofilizador E-C Modulyo acoplado a bomba de vácuo valuPump VLP200 Savant) a -50°C por 48 horas. As amostras foram armazenadas sob temperatura de -18°C até sua utilização. Essa etapa foi realizada no laboratório de Nutrição Humana da “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz” e as subseqüentes no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

4.6.1 Desenvolvimento do método

Devido à falta de um método padronizado para a análise de peptídeos opioides em urina por cromatografia líquida de alta performance, foram inicialmente feitos testes preliminares para determinar as condições mais adequadas para a identificação e possível quantificação dos peptídeos derivados do glúten e da caseína por HPLC. Para isso foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Determinação da faixa de concentração dos peptídeos detectável
- Tempo de corrida
- Degraus de concentração de acetonitrila (ACN) para a extração em mini-coluna compacta Sep-Pack C-18 (extração em fase sólida)
- Gradientes de soluções para cromatografia líquida de alta performance

Inicialmente foi realizado teste preliminar para averiguar a sensibilidade do HPLC em identificar os padrões de peptídeos opioides. Foram elaboradas curvas padrão com os peptídeos β -casomorfina (1-8) [YPFPGPIP], β -casomorfina (1-7) [YPFPGPI], β -casomorfina (1-4) [YPFP] e gliadorfina (α -gliadina 1-7) [YPQPQPF] (GenScript USA Inc.) diluídos em água milli-Q (mQ) em três concentrações 0,1 μ g, 1 μ g e 5 μ g. Após determinação do pico dos padrões foi desenvolvida a primeira metodologia.

As amostras liofilizadas foram concentradas 5 vezes o seu volume inicial, acidificadas com 0,1 μ l de ácido trifluoracético (TFA) e 1 μ g de cada padrão foi incorporado. Em seguida foi realizada a extração.

A extração de peptídeos da urina foi realizada em mini-colunas compactas, C-18 Sep-Pak, 40 x 60 μ m com porosidade de 60Å (Thermo Scientific HyperSep Product Alternative). Para a preparação das soluções foram utilizadas acetonitrila (J. T. Baker) e ácido trifluoracético (Wako Chemicals USA) com grau de pureza cromatográfico e água mQ. A coluna foi ativada, com 55 mL de metanol e equilibrada com 55 mL de uma solução contendo água e 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). A amostra foi carregada no topo da coluna, que foi então lavada com 55 mL de solução 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) e após o esgotamento foi aplicado um protocolo de soluções com diferentes concentrações de acetonitrila.

- Primeira solução: 55 mL 0,01% de ácido trifluoracético (TFA) e 25%, de acetonitrila.
- Segunda solução 55 mL 0,01% de ácido trifluoracético (TFA) e 50% de acetonitrila
- Terceira solução 55 mL 0,01% de ácido trifluoracético (TFA) e 90% de acetonitrila

Os eluentes resultantes da lavagem e de cada concentração de acetonitrila foram coletados, congelados a -18°C e liofilizados a temperatura de -50°C por 48 horas. Depois foram reconstituídos em 2 mL de água mQ e injetadas no aparelho de cromatografia de alta performance sistema binário 20A com auto-sampler, forno de coluna e detecção por diode array (Shimadzu Corporation).

A fase estacionária utilizada foi composta por coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa e uma pré-coluna do mesmo material. Para a preparação das fases móveis foram utilizadas acetonitrila (J. T. Baker) e ácido trifluoracético (Wako) com grau de pureza cromatográfico e água mQ.

A fase móvel foi constituída por duas soluções. A solução A: 0,1 % ácido trifluoracético (TFA) e 99,9% água mQ e solução B: 0,1% ácido trifluoracético (TFA), 90% acetonitrila e 9,9% água mQ. A velocidade do fluxo foi de 1mL/min, temperatura de forno 38°C e faixa UV de detecção 214nm a 280nm. Para facilitar a identificação esse método será chamado de 1. O gradiente de eluição e tempo de corrida da fase móvel estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 - Resumo da metodologia de identificação de peptídeos opioides número 1 (gradiente de acetonitrila 0% a 100%)

Tempo (min)	%Solução A	%Solução B
5	100	0
20	0	0-100
2	0	100
5	100	100-0

Outra metodologia para leitura em HPLC foi testada com alterações apenas do gradiente de eluição e tempo de corrida da fase móvel. Para facilitar a identificação esse método será chamado de 2. A metodologia está resumida na tabela 2.

Tabela 2 - Resumo da metodologia de identificação de peptídeos opioides número 2 (gradiente de acetonitrila 20% a 70%)

Tempo (min)	%Solução A	%Solução B
10	80	20
15	30	20-70
2	0	70-100
3	0	100
5	80	100-20

4.7 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados da concentração de creatinina em urina foram utilizados cálculo de média, desvio padrão e coeficiente de variação. Para comparação de médias entre os diferentes grupos foi utilizado o teste de Tukey adotando o valor de $P < 0,05$ como critério de diferença estatística. O programa utilizado para efetuar o cálculo foi o SAS (System for Statistical Analysis 9.2)

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação psicológica

O quadro clínico da população de autistas, segundo a avaliação psicológica feita pelo método CARS, foi caracterizado por 64% de casos severos, 18% de casos moderados e 18% de casos leves. Esse perfil foi semelhante ao relatado na literatura que indica maior prevalência de casos severos e moderados. Segundo alguns especialistas esse padrão está mudando devido a alterações constantes dos sistemas de diagnóstico e maior conhecimento dos profissionais da área sobre a patologia que permite um diagnóstico de autistas com alto grau de funcionamento, desconhecidos até o final da década de 90 (KLIN, 2006; LEONARD et al., 2010). O resultado está resumido na figura 6.

Figura - 6 Quadro clínico da população autista segundo o método CARS

O retardo mental é um transtorno neuropsiquiátrico presente em 68% dos autistas participantes. Esse resultado expressa o fenótipo descrito em literatura, que aponta para uma prevalência de 60 a 70% (KLIN, 2006).

5.2 Anamnese nutricional

5.2.1 Dados sócio-demográficos

5.2.1.1 Escolaridade pais de autistas

O levantamento dos dados sócio-demográficos das famílias dos autistas participantes revelou informações importantes.

Sobre a escolaridade das mães foi observado que 32%, não concluíram o ensino fundamental, 35,70% concluíram o ensino médio e 14,30% têm nível superior completo. O perfil da escolaridade dos pais demonstrou que 32% não concluíram o ensino fundamental, 35,70% concluíram o ensino médio e 17,80% concluíram o ensino superior.

Os dados revelaram que a escolaridade dos pais e mães de autistas é praticamente igual e também que um 1/3 da população estudada apresenta baixo nível de escolaridade. O resultado é semelhante ao descrito por Barbosa e Fernandes (2009), que avaliaram a qualidade de vida dos responsáveis pelos cuidados dos autistas. Em seu trabalho 39% das mães e 38% dos pais eram analfabetos e o padrão de escolaridade entre pais e mães eram semelhantes. A figura 7 expressa de forma detalhada a escolaridade dos pais dos autistas participantes.

Figura 7 - Escolaridade dos pais de autistas

5.2.1.2 Renda familiar

Os dados demonstram que 60% das famílias possuem renda familiar entre 2 a 4 salários mínimos. Esse resultado é semelhante ao observado no trabalho de Barbosa e Fernandes (2009), onde 56% das famílias entrevistadas tinham renda familiar similar. Os resultados estão mostrados na figura 8.

Figura 8 - Levantamento de renda familiar mensal

5.2.2 Histórico pessoal de doenças

5.2.2.1 Histórico pessoal de doenças: consumo de medicamentos

O resultado da pesquisa indicou que 68% dos autistas fazem tratamento psicofarmacológico. Como o tratamento foca apenas o controle de sintomas específicos uma variedade de drogas é indicada para o tratamento da síndrome. Dentre os fármacos mais consumidos estão a periciazina 25% e a risperidona 21%.

A periciazina é um neuroléptico com propriedades antidopaminérgica, com efeito, antipsicótico. A risperidona faz parte do grupo de drogas denominado de antipsicóticos atípicos que originalmente foram desenvolvidos para o tratamento da psicose. Eles são considerados mais seguros do que os antipsicóticos típicos. A variedade de fármacos consumidos está ilustrada na figura 9.

Figura 9 - Consumo de medicamentos

5.2.2.2 Histórico pessoal de doenças: patologias

O conhecimento do histórico pessoal de doenças permite identificar condições que estão associadas à síndrome. Os dados demonstram elevada prevalência de doenças respiratórias associadas ao sistema imunológico. A prevalência de rinite alérgica foi de 25%, o quadro clínico de alergia respiratória não específica acomete 14,29% dos autistas e 3,57% sofrem de asma.

Diferentes quadros de alergia foram identificados: alergia a alimentos¹ (10,71%), alergia a produtos² (3,57%) e alergia a medicamentos³ (3,57%).

A intolerância ao leite e seus derivados foi verificada em 7,14% dos autistas participantes.

Em ambos os sexos a prevalência de rinite alérgica foi de 25%. A alergia respiratória não específica foi encontrada em 12,50% dos indivíduos do sexo feminino e 15% do sexo masculino. A asma (5%) bem como a alergia a produtos (5%), alergia a medicamentos (5%), alergia a alimentos (15%) e intolerância ao leite e derivados (10%) foram patologias exclusivas do sexo masculino.

Em relação as diferentes faixas etárias que constituíram a população dos autistas foram observados perfis heterogêneos entre os grupos.

A faixa etária de 2 a 8 anos foi a única acometida por alergia a produtos (9,09%). Entre 9 e 13 anos a maior prevalência de foi rinite alérgica (42,86%), asma (14, 29%) e alergia a medicamentos (14,29%).

A faixa etária de 14 a 18 anos apresentou maior prevalência de intolerância ao leite e derivados (25%) e os autistas com idade entre 19 a 33 anos foram os que manifestaram maior prevalência de alergia respiratória não específica (33,33%) e alergia a alimentos (16,67%). Os resultados estão expressos nas figuras 10, 11 e 12.

¹ Alergia a alimentos: alergia a camarão, alimentos que em sua composição apresentam elevada concentração de corante exemplo gelatina.

² Alergia a produtos: produtos de limpeza como detergente e desinfetante

³ Alergia a medicamentos: medicamentos a base de xilocaína e paracetamol

Figura 10 - Prevalência de patologias em autistas

Figura 11 - Prevalência de patologias em autistas segundo o sexo

Figura 12 - Prevalência de patologias em autistas segundo a faixa etária

A literatura descreve incidência elevada de doenças como rinite, asma, dermatite atópica e alergia alimentar em indivíduos portadores da síndrome autística. Alguns grupos de pesquisas afirmam que alterações da resposta do sistema imunológico podem ser um fator causal (BERTOGLIO; HENDREN, 2009).

5.2.2.3 Histórico pessoal de doenças: sintomas gástricos

A prevalência de sintomas gástricos nos autistas foi de 60,71%. O resultado aproxima-se ao descrito por Valicenti-McDermott et al. (2006) que relataram uma prevalência de 70%. Dentre os sintomas observados a flatulência (39,29%) e eructação pós-prandial (14,29%) foram os mais frequentes. Os sintomas de diarreia e de pirose foram presentes em 7,14% dos casos e 3,57% dos autistas manifestaram regurgitação.

A prevalência de flatulência no sexo feminino foi de 37,50% e no sexo masculino 40%. A eructação pós-prandial no sexo feminino foi de 12,50% e no sexo masculino 15%. A regurgitação (12,50%) é um sintoma exclusivo do sexo feminino. A diarreia (10%) e a pirose (10%) ocorreram apenas no sexo masculino.

A diarreia (9,09%) foi constatada apenas na faixa etária de 2 a 8 anos. Nesse grupo de autistas observou-se também uma maior prevalência de flatulência (54,55%).

Os sintomas de pirose (33,33%) e regurgitação (16,67%) foram observados apenas na faixa etária de 19 a 33 anos. Os autistas desse grupo também apresentaram maior prevalência de eructação pós-prandial (33,33%). Os resultados estão ilustrados nas figuras 13, 14 e 15.

Figura 13 - Prevalência de sintomas gástricos em autistas

Figura 14 - Prevalência de sintomas gástricos em autistas segundo o sexo

Figura 15 - Prevalência de sintomas gástricos em autistas segundo a faixa etária

5.2.3 Comportamento inadequado durante as refeições

Os resultados revelaram que 96,42% dos autistas participantes manifestaram comportamento inadequado durante as refeições. O resultado foi semelhante ao descrito na literatura por Johnson et al. (2008) que relatam uma prevalência de 30% a 90%.

O comportamento de comer rapidamente acometeu 50% dos participantes, 46,43% tem o hábito de consumir porções grandes de alimentos e as crises de choro ou risos durante as refeições ocorreram em 39,29% dos casos.

A rejeição de texturas específicas de alimentos foi observada em 39,29% dos autistas. Cerca de 35,71% deles consomem porções muito pequenas de alimentos, 21,43% brincam com os alimentos durante as refeições e 21,43% rejeitam cores específicas de alimentos.

A rejeição de grupos específicos de alimentos foi verificada em 17,86% dos casos e 7,14% dos autistas quando em crises induzem o vômito. Apenas 17,86% dos autistas porcionam os alimentos de forma adequada.

Os achados da literatura sobre os comportamentos inadequados citam a rejeição dos alimentos relacionada a características específicas como textura e cor como os mais frequentes. Na população observada o comportamento de comer rapidamente (50%) e consumir grandes porções de alimentos foram os mais prevalentes (46,43%) (Figura 16).

Figura 16 - Prevalência de comportamento inadequado durante as refeições

5.2.4 Levantamento de hábito alimentar

5.2.4.1 Frequência de alimentos: a frequência de consumo dos diferentes grupos de alimentos pelos autistas está descrita nas tabelas 3 a 10.

Tabela 3 - Frequência de consumo de alimentos grupo das frutas

Alimento	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Às vezes	Nunca
Abacate	0,00%	3,57%	3,57%	0,00%	53,57%	39,28%
Acerola	0,00%	21,42%	0,00%	14,28%	32,14%	32,14%
Banana	32,14%	50,00%	10,71%	3,57%	0,00%	3,57%
Goiaba	0,00%	7,14%	14,28%	3,57%	28,57%	46,43%
Laranja	7,14%	50,00%	7,14%	0,00%	25,00%	10,71%
Maçã	7,14%	46,42%	10,71%	10,71%	14,28%	10,71%
Mamão-formosa	0,00%	21,42%	10,71%	0,00%	21,42%	46,42%
Mamão-papaia	3,57%	28,57%	14,28%	0,00%	28,57%	25,00%
Melancia	3,57%	14,28%	3,57%	3,57%	39,28%	35,71%
Pêra	0,00%	14,28%	3,57%	3,57%	57,14%	21,42%
Vitamina Frutas	3,57%	17,85%	10,71%	3,57%	39,28%	25,00%

A tabela 3 acima mostra que banana é a fruta mais consumida diariamente (32,14%). A frequência semanal apresenta o consumo de uma variedade maior de frutas sendo as mais consumidas: a laranja (50%), a banana (50%), a maçã 46,42%, o mamão-papaia (28,57%), o mamão-formosa (21,42%) e acerola (21,42%).

Tabela 4 - Frequência de consumo de alimentos grupo das hortaliças

Alimento	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Às vezes	Nunca
Abóbora	0,00%	25,00%	3,57%	7,14%	25,00%	39,28%
Abobrinha	0,00%	42,85%	3,57%	10,71%	14,28%	28,57%
Acelga	0,00%	3,57%	3,57%	10,71%	17,85%	64,28%
Alface	14,28%	53,57%	0,00%	0,00%	7,14%	25,00%
Almeirão	0,00%	14,28%	3,57%	3,57%	14,28%	64,28%
Berinjela	0,00%	21,42%	21,42%	7,14%	25,00%	25,00%
Beterraba Cozida	0,00%	32,14%	17,85%	7,14%	14,28%	28,57%
Brócolis	0,00%	14,28%	14,28%	10,71%	17,85%	42,85%
Cenoura Cozida	0,00%	64,28%	7,14%	3,57%	3,57%	21,42%
Cenoura Crua	0,00%	35,71%	7,14%	0,00%	7,14%	50,00%
Chuchu	0,00%	32,14%	14,28%	3,57%	10,71%	39,28%
Couve-flor	0,00%	25,00%	10,71%	3,57%	28,57%	32,14%
Couve-manteiga	0,00%	39,28%	17,85%	0,00%	7,14%	35,71%
Tomate	3,57%	64,28%	3,57%	10,71%	7,14%	10,71%
Vagem	3,57%	0,00%	25,00%	3,57%	21,42%	46,42%

A tabela 4 referente ao consumo de hortaliças mostra que a alface (14,28%) é o alimento mais consumido diariamente. O consumo semanal é caracterizado por uma maior variedade de alimentos. Os mais consumidos são cenoura cozida (64,28%), tomate (64,28%), alface (53,57%), abobrinha (42,85%), cenoura crua (35,71%), couve-manteiga (39,28%), beterraba cozida (32,14%), chuchu (32,14%), couve-flor (25%) e abóbora (25%).

Tabela 5 - Frequência de consumo de alimentos grupo carnes e ovos

Alimento	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Às vezes	Nunca
Bife Cozido (c. bovina)	0,00%	14,28%	3,57%	3,57%	39,28%	39,28%
Bife Grelhado (c. bovina)	0,00%	57,14%	17,85%	0,00%	10,71%	14,28%
Carne Cozida (c. bovina)	0,00%	89,28%	3,57%	3,57%	0,00%	3,57%
Carne Moída (c. bovina)	0,00%	71,42%	7,14%	3,57%	3,57%	14,28%
Carne Suína	0,00%	25,00%	17,85%	7,14%	17,85%	32,14%
Espetinho (c. bovina)	0,00%	3,57%	7,14%	14,28%	50,00%	25,00%
Frango Assado	0,00%	25,00%	21,42%	17,85%	21,42%	14,28%
Frango Molho	0,00%	10,71%	14,28%	10,71%	25,00%	39,28%
Frango Grelhado	0,00%	25,00%	17,85%	10,71%	21,42%	25,00%
Linguiça (c. suína/bovina)	3,57%	28,57%	17,85%	3,57%	28,57%	17,85%
Nuggets (frango)	0,00%	14,28%	7,14%	0,00%	32,14%	46,42%
Omelete	0,00%	42,85%	17,85%	0,00%	17,85%	21,42%
Ovo Frito	0,00%	50,00%	7,14%	0,00%	25,00%	17,85%
Peixe	3,57%	14,28%	17,85%	17,85%	28,57%	17,85%
Salsicha	0,00%	39,28%	10,71%	10,71%	17,85%	21,42%

Nota: Abreviação c.bovina equivale à carne bovina. Abreviação c. suína/bovina equivale carne suína ou bovina.

Na tabela de frequência de consumo ovos, carnes ou produtos a base de carne pode-se observar que não há nesse grupo alimento com consumo diário significativo. A frequência semanal de consumo de carnes e ovos foi variada, os alimentos mais consumidos foram: carne cozida (89,28%), carne moída (71,42%), bife grelhado (57,14%), ovo frito (50,00%), omelete (42,85%), salsicha (39,28%), linguiça (28,57%), carne suína (25,00%) e frango grelhado (25,00%).

Tabela 6 - Frequência de consumo de alimentos grupo leite e derivados

Alimento	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Às vezes	Nunca
Iogurte de Frutas	14,28%	57,14%	0,00%	10,71%	3,57%	14,28%
Leite Fermentado	7,14%	7,14%	14,28%	7,14%	32,14%	32,14%
Leite em Pó	7,14%	0,00%	7,14%	0,00%	17,85%	67,85%
Leite Integral	60,71%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	39,28%
Milk-shake	0,00%	7,14%	0,00%	7,14%	21,42%	64,28%
Molho Branco	3,57%	0,00%	10,71%	7,14%	28,57%	50,00%
Queijo Minas	0,00%	7,14%	17,85%	3,57%	32,14%	39,28%
Queijo Mussarela	3,57%	39,28%	7,14%	3,57%	17,85%	28,57%
Queijo Parmesão	0,00%	17,85%	3,57%	3,57%	3,57%	71,42%
Queijo Prato	0,00%	7,14%	3,57%	3,57%	17,85%	67,85%
Queijo Provolone	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	7,14%	92,85%
Requeijão	7,14%	14,28%	3,57%	10,71%	28,57%	35,71%
Ricota	0,00%	0,00%	0,00%	3,57%	14,28%	82,14%
Pudim	0,00%	3,57%	10,71%	21,42%	39,20%	25,00%

Nesse grupo o alimento de maior consumo diário foi o leite integral (60,71%). O iogurte de frutas (57,14%) e queijo tipo mussarela (39, 28%) foram os alimentos mais consumidos semanalmente.

Tabela 7- Frequência de consumo de alimentos grupo cereais e tubérculos

Alimento	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Às vezes	Nunca
Arroz Branco Cozido	96,42%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	3,57%
Batata Cozida	7,14%	60,71%	3,57%	7,14%	14,28%	7,14%
Batata Frita	0,00%	14,28%	35,71%	7,14%	32,14%	10,71%
Biscoito Maria	3,57%	7,14%	7,14%	3,57%	25,00%	53,57%
Biscoito de Polvilho	3,57%	25,00%	10,71%	3,57%	35,71%	21,42%
Biscoito Recheado	10,71%	21,43%	14,28%	7,14%	25,00%	21,43%
Biscoito Salgado	7,14%	25,00%	10,71%	7,14%	17,85%	32,14%
Bolo Simples	3,75%	42,85%	17,84%	3,57%	25,00%	7,13%
Farofa	3,57%	10,71%	10,71%	0,00%	39,28%	35,71%
Macarrão Cozido	10,71%	71,42%	0,00%	3,57%	7,14%	7,14%
Mandioca	0,00%	21,42%	17,85%	10,71%	32,14%	17,85%
Pão Bisnaguinha	28,57%	25,00%	0,00%	0,00%	3,57%	42,85%
Pão de Forma	7,14%	28,57%	7,14%	0,00%	46,42%	10,71%
Pão Francês	42,85%	35,71%	7,14%	0,00%	10,71%	3,57%
Pipoca	3,57%	35,71%	10,71%	10,71%	32,14%	7,14%
Purê de Batata	0,00%	28,57%	17,85%	3,57%	28,57%	21,42%

Os alimentos mais consumidos diariamente no grupo de cereais e tubérculos foram o arroz (96,42%), pão francês (42,85%) e pão bisnaguinha (28,57%). A frequência de consumo semanal foi marcada por uma grande variedade de alimentos. Os mais consumidos foram: macarrão cozido (71,42%), batata cozida (60,71%), bolo simples (42,85%), pão francês (35,71%), pipoca (35,71%), purê de batata (28,57%), pão de forma (28,57%), biscoito salgado (25,00%), biscoito de polvilho (25,00%) e pão bisnaguinha (25,00%).

Tabela 8 - Frequência de consumo de alimentos grupo doces e açúcar

Alimento	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Às vezes	Nunca
Achocolatado	35,71%	10,71%	0,00%	3,57%	14,28%	35,71%
Açúcar refinado/cristal	67,85%	10,71%	0,00%	0,00%	10,71%	10,71%
Chocolate	14,28%	35,71%	10,71%	7,14%	17,85%	14,28%
Goiabada	0,00%	3,57%	3,57%	10,71%	25,00%	57,14%
Mel	3,57%	7,14%	0,00%	3,57%	17,85%	67,85%
Suco Artificial	78,57%	7,14%	0,00%	0,00%	14,28%	0,00%

Nesse grupo pode se observar que o suco artificial (78,57%), açúcar (67,85%) e achocolatado (35,71%) foram os alimentos mais consumidos diariamente. O chocolate (35,71%) foi o alimento mais consumido semanalmente. O que chamou a atenção para esse resultado foi o consumo diário de suco artificial ser superior ao do açúcar.

Tabela 9 - Frequência de consumo de alimentos óleos e gorduras

Alimento	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Às vezes	Nunca
Azeite Oliva	42,85%	17,85%	0,00%	0,00%	17,85%	21,42%
Bacon	3,57%	17,85%	0,00%	7,14%	14,28%	57,14%
Banha	0,00%	0,00%	0,00%	3,57%	3,57%	92,85%
Margarina	46,42%	17,85%	0,00%	0,00%	17,85%	17,85%
Manteiga	7,14%	7,85%	0,00%	0,00%	21,42%	64,28%
Óleo Vegetal (milho/soja)	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Nota: Apenas óleos de soja e de milho foram citados pelos participantes.

Os alimentos mais consumidos diariamente foram óleo vegetal (100%), a margarina (46,42%) e o azeite de oliva (42,85%). O consumo semanal de bacon, margarina e azeite de oliva foi de (17,85%).

Tabela 10 - Frequência de consumo de alimentos grupo leguminosas

Alimento	Diário	Semanal	Quinzenal	Mensal	Às vezes	Nunca
Feijão (grão e caldo)	82,14%	7,14%	0,00%	0,00%	0,00%	10,71%
Feijão (somente o grão)	3,57%	0,00%	0,00%	0,00%	3,57%	92,86%
Grão de Bico	0,00%	3,57%	0,00%	0,00%	17,85%	78,57%
Lentilha	0,00%	3,57%	3,57%	0,00%	17,85%	75,00%
Soja	0,00%	7,14%	0,00%	0,00%	14,28%	78,57%
Carne de Soja	0,00%	0,00%	0,00%	7,14%	21,42%	71,42%
Leite de Soja	10,71%	10,71%	3,57%	0,00%	7,14%	67,85%

Nota: Carne de soja equivale à proteína de soja texturizada. Leite de soja equivale ao extrato hidrossolúvel de soja

Das leguminosas investigadas o feijão foi o único alimento que teve um consumo expressivo.

5.2.4.2 Adequação do consumo de nutrientes

Para a avaliação da adequação do consumo de nutrientes foi estabelecido faixas de classificação. Os valores inferiores a 90% da recomendação foram considerados consumo insuficiente, de 90% a 110% adequado e acima de 110% excesso.

Na avaliação do consumo de macronutrientes levando em consideração os intervalos propostos 57,14% dos autistas consumiram energia acima do recomendado.

A ingestão de carboidrato foi alta 96,43% apresentam consumo superior à faixa de normalidade.

O consumo de proteína também foi elevado 100% dos participantes ingeriram quantidades superiores ao recomendado.

Sobre os lipídios 25% apresentaram consumo adequado e 39,29% insuficiente.

A ingestão de fibras da população estudada foi muito baixa. Cerca de 92,86% consumiram quantidade considerada insuficiente. A figura 17 expressa os resultados expostos.

Figura 17 - Porcentagem adequação do consumo de macronutrientes da população de autistas

Quanto aos minerais o consumo de cálcio pela população estudada foi baixo, sendo considerada insuficiente a quantidade ingerida por 71,43% dos autistas.

O consumo de fósforo foi elevado sendo que 60,71% dos autistas ingeriram quantidades acima do recomendado.

A ingestão de ferro foi alta, considerando que 92,86% dos autistas consumiram quantidades superiores aos da recomendação.

Quanto ao mineral zinco o consumo também foi considerado elevado, uma vez que 89,29% apresentaram ingestão superior ao recomendado. A figura 18 resume o resultado sobre o consumo de minerais.

Figura 18 - Porcentagem adequação do consumo de minerais da população de autistas

Em relação à vitamina A cerca de 60,71% dos autistas apresentaram consumo inferior ao recomendado.

Quanto ao ácido ascórbico (vitamina C) os resultados mostraram que 50% da população consomem quantidades insuficientes e 46,43% quantidades superiores ao recomendado.

Para o folato 42,86% dos participantes apresentaram um consumo superior ao estipulado pela recomendação enquanto 21,43% ingeriram quantidades adequadas.

Os resultados demonstraram que os autistas nesse estudo tiveram uma ingestão elevada de tiamina e de piridoxina, 96,43% e 92,86% respectivamente.

A ingestão de niacina e riboflavina também foi alta, 89,29% da população de autistas consumiram quantidades acima do recomendado. Os resultados podem ser observados na figura 19 abaixo.

Figura 19 - Porcentagem adequação do consumo de vitaminas da população de autistas

5.3 Registro fotográfico do comportamento inadequado durante as refeições

O registro fotográfico permitiu maior reflexão e conhecimento do comportamento dos autistas durante as refeições. Nele pode ser observado alguns comportamentos como comer grandes quantidades de alimentos. Esses interferem diretamente no consumo de alimentos e nutrientes e consequentemente no estado nutricional.

Figura 20 -Comportamento de isolamento durante a refeição
Fonte: Arquivo projeto de pesquisa

Figura 21 -Comportamento de consumo de grande volume de alimentos
Fonte: Arquivo projeto de pesquisa

Figura 22 - Comportamento de consumo de pequenas porções de alimentos
Fonte: Arquivo projeto de pesquisa

Figura 23 - Comportamento de consumo de grandes porções de alimentos
Fonte: Arquivo projeto de pesquisa

Figura 24 - Comportamento de apatia durante a refeição
Fonte: Arquivo projeto de pesquisa

Figura 25 - Comportamento de brincar com objetos durante a refeição
Fonte: Arquivo projeto de pesquisa

5.4 Análise das concentrações de creatinina em urina

No grupo de autistas a concentração de creatinina variou em uma faixa de valores de 0,114 mg/mL a 2,296 mg/mL, sendo seu valor médio de 1,15 mg/mL $\pm$ 0,56 e o intervalo de confiança de (IC 95%) 0,20. No grupo controle de parentes do mesmo sexo a concentração de creatinina variou em uma faixa de valores 0,317 mg/mL a 2,571 mg/mL sendo seu valor médio de 1,24 mg/mL $\pm$ 0,67 e o intervalo de confiança de (IC95%) 0,24. Entre os grupos não houve diferença estatística. O resultado está ilustrado na figura 26.

Figura 26 - Média de valores concentração de creatinina em urina de autistas (1,15 mg/mL) e grupo controle (1,24 mg/mL). Análise de creatinina Método de Jaffé

Em uma nova análise estatística foi observada a influência do grau de parentesco na concentração de creatinina. Primeiramente foi avaliado o grupo de autistas com grupo controle formado apenas por pais. A concentração de creatinina dos autistas variou em uma faixa de valores de 0,114 mg/mL a 2,296 mg/mL, sendo seu

valor médio de $1,20 \text{ mg/mL} \pm 0,57$ e o intervalo de confiança igual a (IC95%) 0,22. O grupo controle composto por pais de autistas apresentou uma concentração de creatinina que variou entre $0,317 \text{ mg/mL}$ a $2,571 \text{ mg/mL}$, sendo seu valor médio de $1,16 \text{ mg/mL} \pm 0,69$ e intervalo de confiança igual a de (IC95%) 0,27. O resultado expressa semelhança da concentração de creatinina entre autistas e seus pais. Ele pode ser observado na figura 27.

Figura - 27 Média de valores de concentração de creatinina de autistas ($1,20 \text{ mg/mL}$) e grupo controle formado apenas por pais ($1,16 \text{ mg/mL}$). Análise de creatinina Método de Jaffé

A análise do grupo de autistas que tem como grupo controle irmãos, tios e primos apresentaram resultados diferentes. A concentração de creatinina dos autistas variou em uma faixa de valores de $0,500 \text{ mg/mL}$ a $1,472 \text{ mg/mL}$, sendo seu valor médio de $0,85 \text{ mg/mL} \pm 0,43$ e o intervalo de confiança igual a (IC95%) 0,42. A concentração de creatinina na urina do grupo controle formado por parentes (irmão, tio, primo) de autistas teve valores entre $1,480 \text{ mg/mL}$ a $2,089 \text{ mg/mL}$, o valor médio de $1,72 \text{ mg/mL} \pm 0,25$ e intervalo de confiança igual a (IC95%) 0,24. Esses valores expressam

uma diferença estatística entre autistas e grupo controle formado por parentes (figura 28). Não foram encontradas informações em literatura sobre a concentração de creatinina em urina de pais e parentes de autistas, apenas poucos estudos que compararam a concentração de creatinina em urina de crianças autistas com grupo controle formado por crianças com desenvolvimento normal.

Figura 28 -Média de valores de concentração de creatinina de autistas (0,85 mg/mL) e grupo controle formado apenas por parentes (1,72 mg/mL). Análise de creatinina Método de Jaffé

5.5 Padronização de método para cromatografia líquida de alta performance

5.5.1 Determinação de gradiente de eluição e tempo de corrida da fase móvel

Inicialmente foram realizadas análises com o objetivo de avaliar a sensibilidade de detecção dos métodos 1 e 2.

A primeira etapa foi avaliar a capacidade dos métodos em identificar os padrões de peptídeos separadamente. Para isso, foram elaboradas curvas padrão com os peptídeos a serem analisados em três diferentes concentrações 0,1 µg, 1 µg e 5 µg, dissolvidos em água mQ. Em seguida as soluções foram cromatografadas.

Os resultados demonstraram que o método 1 e 2 identificaram os padrões nas três faixas de detecção proposta, mas o pico gerado por qualquer um dos peptídeos na quantidade de 0,1 µg embora claramente detectável mostrou um perfil simples e de baixa intensidade.

Na prática é inviável a análise nessa faixa de detecção uma vez que a urina é constituída por mais de 1500 peptídeos e proteínas, os quais podem ser confundidos nessas condições de análise (COON et al., 2008).

Muitos compostos presentes na urina apresentam picos de intensidade elevada, maiores do que os peptídeos analisados, tornando quase impossível a detecção destes últimos em quantidade abaixo de 0,1 µg. Os perfis cromatográficos das três concentrações da β-casomorfina (1-7) estão ilustrados nas figuras 29, 30 e 31.

Figura 29 -Cromatograma do perfil da solução contendo 0,1 µ de β-casomorfina (1-7) dissolvida em água mQ. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa, gradiente de acetonitrila de 0% a 100% (método 1) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

Figura 30 -Cromatograma do perfil da solução contendo 1 µg de β-casomorfina (1-7) dissolvida em água mQ. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa, gradiente de acetonitrila de 0% a 100% (método 1) e faixa de detecção em 214nm a 280nm

Figura 31 - Cromatograma do perfil da solução contendo 5 µg de β-casomorfina (1-7) dissolvida em água mQ. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa, gradiente de acetonitrila de 0% a 100% (método 1) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

A segunda etapa foi avaliar a sensibilidade dos métodos em distinguir os quatro padrões de peptídeos em uma mesma solução. Foram dissolvidos em água mQ 1 µg de cada padrão e injetado no HPLC. O resultado da análise identificou que o método 1 não distinguiu os picos da β-casomorfina (1-7) e β-casomorfina (1-8). O perfil cromatográfico da solução está exposto na figura 32.

Figura 32 - Cromatograma do perfil da solução contendo 1 µg de β-casomorfina (1-4), β-casomorfina (1-7), β-casomorfina (1-8) e gliadorfina (1-7) dissolvidas em água mQ. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa, gradiente de acetonitrila de 0% a 100% (método 1) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

Esse resultado provavelmente está associado aos gradientes da fase móvel e o tempo de corrida adotado. Reichelt et al. (1997), Reichelt et al. (1998) e Shanahan et al. (2000) obtiveram sucesso em identificar e quantificar de forma indireta peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína. Em suas análises utilizaram fase móvel composta por três diferentes gradientes com variações de concentração de acetonitrila mais suaves. O tempo de corrida descrito na metodologia dos trabalhos citados foi superior a 60 minutos.

Com o método 2 foi possível distinguir claramente os peptídeos opioides. Os picos da β-casomorfina (1-7) e β-casomorfina (1-8) na solução que continha 1 µg dos quatro padrões de peptídeos, apresentaram os tempos de retenção diferentes. O cromatograma da análise está ilustrado na figura 33.

Figura 33 - Cromatograma do perfil da solução contendo 1 µg de β-casomorfina (1-4), β-casomorfina (1-7), β-casomorfina (1-8) e gliadorfina (1-7) dissolvidas em água mQ. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa, gradiente de acetonitrila de 20% a 70% (método 2) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

O método 1 apresentou uma vantagem sobre o 2. A identificação da β-casomorfina (1-4) foi bem clara, apesar de o pico ser menos intenso do que os dos demais peptídeos. No método 2 o pico foi amplo e achatado, a ponto de não ser distinguível no meio do perfil de urina. Nas figuras 34 e 35 está ilustrado o perfil cromatográfico da β-casomorfina (1-4) nos dois métodos.

Figura - 34 Cromatograma do perfil da solução contendo 1 µg de β-casomorfina (1-4) dissolvida em água mQ. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa, gradiente de acetonitrila de 0% a 100% (método 1) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

Figura - 35 Cromatograma do perfil da solução contendo 1 µg de β-casomorfina (1-4) dissolvida em água mQ. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa, gradiente de acetonitrila de 20% a 70% (método 2) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

Esse resultado também confirma a necessidade de mais testes para definir os gradientes da fase móvel e o tempo de corrida para o desenvolvimento de um método com maior sensibilidade para a detecção de β-casomorfina (1-4), pois os picos foram identificados em soluções com água mQ que é praticamente isenta de qualquer substância que possa mascarar a leitura do HPLC sendo muito diferente da urina que é constituída por vários compostos que produzem picos intensos.

Depois dos testes com soluções compostas por água mQ e padrões de peptídeos foram feitas análises com urina para avaliar a sensibilidade dos dois métodos.

5.5.2 Caracterização da amostra de urina

Para a caracterização inicial da urina foram avaliados o pH, volume e peso seco. Os resultados identificaram uma variabilidade interpessoal dos parâmetros observados. O conhecimento das características das amostras permitiu desenvolver um método com controle de variáveis que podem interferir nos resultados das análises. O pH das urinas foi corrigido com a adição de 0,1 µl de ácido trifluoracético e a reconstituição da urina

liofilizada foi padronizada de acordo com o volume original das amostras. Os perfis das amostras estão resumidos na tabela 11.

Tabela 11 - Resumo dos valores de pH, volume e peso seco das amostras de urina de três voluntários saudáveis

Amostra	pH urina	Volume (mL)	Peso seco (g)
Amostra 1	6,14	30	0,75
Amostra 2	7,77	28,8	0,65
Amostra 3	6,61	16	0,47

As amostras de urina sem os padrões foram cromatografadas para verificar a complexidade e a variabilidade entre os perfis de urinas de indivíduos normais.

Na primeira análise foi incorporado nas amostras de urina 1 µg de cada padrão em seguida foram cromatografadas.

Na segunda análise foi incorporado nas amostras de urina 1 µg de cada padrão em seguida passaram por extração em coluna Sep-Pack e foram cromatografadas.

Os resultados indicaram que os dois métodos testados foram capazes de identificar os padrões na urina mesmo após a extração em coluna Sep-Pack. Na figura 36 é ilustrado o perfil cromatográfico pelo método 2 da solução contendo 1 µg de cada peptídeo em água mQ e o perfil cromatográfico da fração da urina eluída da coluna Sep-Pack com 25% de acetonitrila, adicionada de 1 µg de cada peptídeo. Em ambas é possível identificar os picos dos padrões, o que confirma a capacidade dos métodos desenvolvidos em identificar os peptídeos, nesta quantidade.

Cromatograma solução de água mQ com 1 µg dos padrões

Cromatograma urina com 1 µg dos quatro peptídeos após extração em SEP-PACK C-18

Figura 36 - Cromatograma do perfil da solução contendo 1 µg dos quatro peptídeos dissolvidos em água mQ e cromatograma do perfil do eluente coletado da extração em coluna Sep-Pack com 25% de acetonitrila. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa, gradiente de acetonitrila de 20% a 70% (método 2) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

Apesar do resultado o método 2 foi mais eficiente, reduziu o número de picos de alta intensidade na região de detecção dos peptídeos. A figura 37 demonstra os cromatogramas dos dois métodos. Nela é possível observar que no método 2 a

identificação é bem mais fácil, pois os peptídeos aparecem em uma região com menos picos da urina.

Figura 37 - Cromatogramas perfil de urina contendo 1 μ g dos padrões testados método 1 e método 2. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm fase reversa e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

5.5.3 Metodologia para extração em coluna SEP-PACK C-18

Em análise posterior foi avaliada a quantidade de peptídeos recuperada após a extração em mini-coluna compacta Sep-Pack C-18 (extração em fase sólida). As metodologias 1 e 2 foram empregadas. Os resultados apontam para uma perda considerável dos padrões testados.

Para ilustrar, foi realizado o cálculo de recuperação da gliadorfina (1-7) após extração. O cálculo da área foi feito pelo programa do HPLC. O resultado indica uma recuperação de 53,59%.

Nas figuras 38 e 39, estão ilustrados os dois cromatogramas utilizados para estimar a porcentagem de retenção do peptídeo após a fase de extração. Nelas é possível visualizar a diferença entre os picos e também os picos da β -casomorfina (1-4) que são menores.

Figura 38 - Cromatograma do perfil de urina contendo 1µg dos quatro padrões. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm, gradiente de acetonitrila de 20% a 70% (método 2) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

Figura 39 -Cromatograma do perfil do eluente coletado da fase de extração com solução contendo 25% de acetonitrila. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm, gradiente de acetonitrila de 20% a 70% (método 2) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

Os picos de β -casomorfina (1-7) e β -casomorfina (1-8) saem na fração de 50% de acetonitrila que podem ser observados na figura 40.

Figura 40 -Cromatograma do perfil do eluente coletado da fase de extração com solução contendo 50% de acetonitrila. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm, gradiente de acetonitrila de 20% a 70% (método 2) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

Os eluentes coletados de cada concentração de acetonitrila foram cromatografados. Foi observado que os peptídeos são eluídos no limite entre os degraus de 25% e 50% de acetonitrila. O perfil cromatográfico dos materiais eluídos revelaram também que os peptídeos β -casomorfina (1-7) e β -casomorfina (1-8) foram identificados no limite de detecção estabelecidos pelos métodos 1 e 2.

Os resultados indicam a necessidade de novos testes para o desenvolvimento de um novo protocolo de degraus de acetonitrila para a extração em mini-coluna compacta Sep-Pack C-18 (extração em fase sólida). O resultado pode ser observado na figura 41.

Figura 41 - Cromatograma do perfil do eluente coletado da fase de extração com solução contendo 50% de acetonitrila. Condições cromatográficas: coluna C-18 250 mm x 4.5mm, gradiente de acetonitrila de 0% a 100% (método 1) e faixa de detecção em UV 214nm a 280nm

6 DISCUSSÃO

Os dados sócios demográficos demonstraram que 60% das famílias dos autistas participantes possuem renda mensal entre dois a quatro salários mínimos e que 1/3 possuem baixa escolaridade. O resultado é semelhante ao descrito por Barbosa e Fernandes (2009).

Para esse projeto o conhecimento prévio da escolaridade dos pais influenciou diretamente na escolha dos questionários utilizados no levantamento de hábito alimentar. Os dados coletados serão instrumentos que irão nortear a escolha de metodologias para as atividades futuras da pesquisa, pois o próximo passo é o desenvolvimento de uma intervenção dietoterápica. Whiteley et al. (2010) após o término de um estudo de dois anos sobre a eficácia da dieta isenta de glúten e caseína, concluíram que o conhecimento da renda familiar é essencial para a elaboração de intervenções nutricionais, pois fornecem informações sobre acessibilidade aos alimentos.

O perfil do quadro clínico da população estudada é semelhante à descrita em literatura. Ele é caracterizado por maior prevalência de casos graves (64%) e 68% encontram-se na faixa de retardo mental. O conhecimento do grau de comprometimento dos autistas também é um fator importante para a escolha do modelo de estudo. A metodologia da pesquisa também foi influenciada pelo quadro clínico dos participantes, principalmente sobre o método utilizado para a coleta de urina. Alguns autistas manifestaram dificuldade em aceitar o coletor, para algumas famílias foi necessário um maior número de recipientes para uma adaptação prévia do autista participante.

O tratamento psicofarmacológico é complexo, concentrando-se em uma abordagem medicamentosa destinada a redução de sintomas alvo (ASSUNPÇÃO JÚNIOR; PIMENTEL, 2000). Apesar de ser uma prática comumente aplicada em tratamento de autistas de todas as idades, é feito com base empírica, pois, não existe na atualidade terapia medicamentosa que trate os sintomas nucleares do autismo e também não há tratamentos farmacológicos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration). As intervenções farmacológicas por terem como alvo os sintomas específicos que acompanham os sintomas nucleares incapacitam o funcionamento do

indivíduo não permitindo que ocorram intervenções educacionais e comportamentais de primeira linha. Devido à diversidade de princípios ativos utilizados nem sempre específicos para os sintomas alvo, estes afetam grande gama de funções neurológicas e cerebrais não necessariamente afetadas pelo autismo (NICOLOV; JONKER; SCAHILL, 2006).

A elevada prevalência de autistas (68%) que fazem tratamento psicofarmacológico deixa clara a necessidade do desenvolvimento de terapias coadjuvantes para o controle dos sintomas e tratamento dos fatores nucleares.

O histórico dos autistas apresenta elevada ocorrência de doenças relacionadas à resposta anormal do sistema imunológico. Esse dado reforça a tese de que alterações do sistema imunológico pode ser um fator causal. Essa condição também é citada como fator associado à teoria de sobrecarga do sistema opioide por peptídeos de origem alimentar (leite e trigo).

A elevada ocorrência de sintomas gástricos citados na literatura também foi identificada na população participante. Os mais frequentes foram a flatulência (39,29%) e a eructação-pós prandial (14,29%). Um dos fatores que podem estar associados à flatulência é a colonização da microbiota intestinal por microrganismos patogênicos. Essa condição pode contribuir para o aumento da permeabilidade intestinal.

A ocorrência de eructação pós-prandial pode estar relacionada à sobrecarga do sistema opioide, pois o estímulo exacerbado da atividade opioide pode induzir o aumento do tempo de esvaziamento gástrico e alterações na atividade mio-elétrica que conduzem a sintomas de espasmo, dor, constipação intestinal e eructação pós-prandial (WAKEFIELD et al., 2002).

Na população observada a ocorrência de comportamentos inadequados durante a refeição é elevada. O comportamento de comer rapidamente e consumir porções exageradas de alimentos exerce influência direta sobre a ingestão de alimentos. O cálculo do consumo de nutrientes evidenciou um elevado consumo de calorias, carboidratos e proteínas.

Um dos fatores que está relacionado ao consumo elevado de calorias é que dentro das atividades desenvolvidas nas clínicas o aprender a comer com talheres e reforço do comportamento adequado durante as refeições é estimulado. Para essa

atividade eles fazem refeições como almoço e alguns autistas quando chegam ao seu domicílio repetem a refeição.

Em entrevista com os pais o que também ficou evidente é que muitos identificam o comportamento de comer grandes volumes de comida com o comportamento de crianças saudáveis. Uma frase comumente citada pelos pais em entrevistas é “apesar de tudo ele come muito bem, igual a uma pessoa normal”.

As principais fontes de calorias da dieta são os carboidratos e as proteínas, pois, o consumo desses macronutrientes é superior ao recomendado.

Apesar da frequência de alimentos indicar um consumo diário de leite integral por 60,71% dos autistas e consumo semanal de iogurte de fruta por 57,14% as quantidades são insuficientes, pois a porcentagem de adequação de cálcio é baixa para esse mineral.

O consumo de frutas e hortaliças é baixo, pois a adequação da ingestão de fibras, ácido ascórbico e vitamina A para a maioria da população estudada é insuficiente.

O resultado da análise de concentração de creatinina na urina sugere influência de fatores genéticos sobre o metabolismo da creatina, mas para afirmar essa relação são necessários mais estudos com número maior de participantes e também de populações com faixa etária mais homogênea. Para pesquisas posteriores análises de genes relacionados ao metabolismo da creatina são necessárias.

Atualmente existem poucos trabalhos sobre a relação entre autismo e metabolismo da creatina. Whiteley et al. (2006) observaram baixos níveis de creatinina na urina de crianças com transtorno invasivo do desenvolvimento. Apesar das evidências os mecanismos envolvidos não foram totalmente elucidados. O erro metabólico do transporte de creatina foi identificado em autistas, sua etiologia é genética, mutações hemizigóticas no gene (SLC6A8/CRTR1) que é responsável pelo transporte de creatina, foram encontradas, mas outros mecanismos já foram citados (PÓO-ARGÜELLES et al., 2006; WHITELEY et al., 2006).

Os resultados iniciais das análises realizadas para o desenvolvimento do método de identificação e quantificação de peptídeos opioides em urina demonstraram a necessidade de mais testes para encontrar os degraus de concentração de acetonitrila adequados à extração de peptídeos em mini-colunas Sep-Pack C-18 como também um

gradiente de fase móvel e tempo adequado de corrida a serem adotados para a análise em HPLC.

O desenvolvimento de métodos que identifiquem e quantifiquem os peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína em urina ainda é um desafio. Hoje é necessária a realização de pesquisas para criar metodologias de análise de peptídeos opioides em fluidos corpóreos mais confiáveis, possíveis de reprodução. Na literatura os resultados positivos obtidos em estudos não são replicáveis. As pesquisas de Reichelt e colaboradores (1997), Reichelt e colaboradores (1998), Solaas et al. (2002), Liu, Heiberg e Reichelt. (2007) e de Shanahan e colaboradores (2000) identificaram e quantificaram de forma indireta peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína, mas os estudos de Cass et al. (2008), Hunter et al. (2003) e outros grupos de pesquisa não obtiveram os mesmos resultados.

A urina humana está sendo largamente empregada como biomarcador para monitoramento de indivíduos e populações. Ela apresenta algumas vantagens em seu emprego como a praticidade do procedimento para efetuar a coleta, método não invasivo e também os resultados das análises não sofrem influência do consumo de lipídios como é o caso do sangue (BARR et al., 2005). Estudos sobre o proteoma da urina têm revelado mais de 1500 diferentes proteínas e peptídeos. Devido aos fatos descritos as proteínas presentes na urina estão sendo exaustivamente estudadas como possíveis biomarcadores para uma gama variada de doenças (COON et al., 2008).

Esta abordagem tem sido aplicada a várias doenças que alteram o perfil proteico da urina como câncer de próstata, câncer de bexiga, nefropatia diabética, insuficiência renal crônica, transplantes e complicações associadas, mieloma, disfunção renal devido à toxicidade de metais pesados e doenças psiquiátricas como o autismo (COON et al., 2008; SHANAHAN et al., 2000).

A importância do estudo do proteoma em urina para a síndrome do espectro autista está no fato de que a etiologia desta patologia está associada a alterações do metabolismo proteico.

Em diversas pesquisas metabólitos de origem proteico foram identificados na urina de autistas como elevadas concentrações de ácido úrico e trans-indolil-3-

acrililglicina. Também foram observadas baixas concentrações do aminoácido tirosina e creatinina. (PAGE, 2000; WHITELEY et al., 2006).

Dentre as alterações relacionadas ao perfil proteico da urina de autistas a elevada concentração de peptídeos opioides derivados do glúten e da caseína é a mais estudada. Os mecanismos que desencadeiam este perfil ainda não foram totalmente elucidados e a ausência de métodos possíveis de reprodução criaram uma lacuna para a compreensão da relação entre alimentação e comportamento autista.

O reconhecimento da patologia e também a criação de biomarcadores seguros contribuem para um diagnóstico precoce da doença possibilitando o acesso a tratamentos mais adequados que acarretem a melhora do quadro clínico e consequentemente da qualidade de vida dos autistas.

As pesquisas com finalidade de criar novos tratamentos coadjuvantes e exames de diagnóstico para o autismo são de grande importância em um país como o Brasil em virtude do elevado número de casos de autistas que não tem acesso ao diagnóstico e nem tratamento adequado. Até a presente data não existe no país dado oficial sobre a prevalência do autismo. Informações apontam para a média de 50 mil autistas, mas estima-se que existem pelo menos 1 milhão sem diagnóstico (VADASZ, 2007).

7 CONCLUSÕES

Do presente trabalho foram sugeridas as seguintes conclusões:

- O quadro clínico da população participante é semelhante à descrita em literatura.
- A prevalência de condições fisiológicas como disfunções do sistema imune e sintomas gástricos associados à teoria do excesso de peptídeos opioides é alta no grupo de autistas estudado.
- O comportamento inadequado durante as refeições influencia o consumo de alimentos e nutrientes.
- A população estudada apresenta elevado consumo de calorias, carboidrato e proteína.
- O consumo de tiamina, niacina, riboflavina, piridoxina (vitamina B6), folato, ferro, zinco e fósforo é elevado na população estudada.
- A ingestão de fibra, cálcio, vitamina A, ácido ascórbico (vitamina C) são baixas no grupo observado.
- O resultado da análise da concentração de creatinina na urina evidencia uma possível relação entre alterações de metabolismo da creatina e fatores genéticos.
- Os métodos de análise de peptídeos opioides por cromatografia líquida de alta performance padronizados nesse estudo são capazes de identificar padrões de β -casomorfina (1-4), β -casomorfina (1-7), β -casomorfina (1-8) e gliadorfina (1-7), mas o método codificado como 2 apresenta maior especificidade para identificar os padrões.
- O protocolo proposto para extração de peptídeos em fase sólida deve ser reavaliado.

REFERÊNCIAS

AFZAL, N.; MURCH, S.; THIRRUPATHY, K.; BERGER, L.; FAGBEMI, A.; HEUSCHKEL, R. Constipation with acquired megarectum in children with autism. **Pediatrics**, Vermont, v. 112, n. 4, p. 939-942, 2003.

AHEARN, W.H.; CASTINE, T.; NAULT, K.; GREEN, G. An assessment of food acceptance in children with autism and pervasive developmental disorder-not otherwise specified. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, New York, v. 31, n. 5, p. 505-511, 2001.

AKIL, H.; WATSON, S.J.; YOUNG, E.; LEWIS, M.E.; KHACHATURIAN, H.; WALKER, J.M. Endogenous opioids: biology and function. **Annual Review Neuroscience**, Palo Alto, v. 7, p. 223-255, 1984.

ALBERTI, A.; PIRRONE, P.; ELIA, M.; WARING, R.H.; ROMANO, C. Sulphation deficit in "low functioning" autistic children: a pilot study. **Biological Psychiatry**, New York, v. 46, p. 420-424, 1999.

AL-MOSALEM, O.A.; EL-ANSARY, A.; ATTAS, O.; AL-AYADHI, L. Metabolic biomarkers related to energy metabolism in Saudi autistic children. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 42, p. 949-957, 2009.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnosis and statistical manual of mental disorders: DSM** 4th ed. Washington, 2000 TR 2003.

AMORIM, M.M.A.; JUNQUEIRA, R.C.; JOKL, L. Consumo de óleo e gordura nas preparações do almoço self service. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 2, p. 217-223, 2010.

APICHARTSRANGKOON, A. Dynamic viscoelastic properties of heated gluten/soy protein gels. **Food Engineering and Physical Properties**, Georgia, v. 67, n. 2, p. 653-657, 2002.

ASHWOOD, P.; ANTHONY, A.; PELLICER, A.; TORRENTE, F.; WALKER-SMITH, J.A.; WAKEFIELD, A. J. Intestinal lymphocyte populations in children with regressive autism: evidence for extensive mucosal immunopathology. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v. 23, p. 504-517, 2003.

ASPERGER, H. Psychopathology of children with celiac disease. **Annales Paediatrici. International Review of Pediatrics**, Basel, New York, Karger, v. 197, p. 346-351, 1961.

ASSUNPÇÃO JÚNIOR, F.B.; PIMENTEL, A.C.M. Autismo Infantil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 22, (supl. 1), S37-S39, 2000.

BANKS, W.A.; KASTIN, A.J. A brain-to-blood carrier-mediated transport system for small, N-tyrosinated peptides. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 21, n. 6, p. 943-946, 1984.

BARBOSA, M.R.P.; FERNANDES, F.D.M. Qualidade de vida dos cuidadores de crianças com transtorno do espectro autístico. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 482-486, 2009.

BARR, D.B.; WILDER, L.C.; CAUDILL, S.P.; GONZALEZ, A.J.; NEEDHAM, L.L.; PIRKLE, J.L. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. **Environmental Health Perspectives**, Triangle Park, v. 113, n. 2, p. 192-200, 2005.

BERTOGLIO, K.; HENDREN, R.L. New developments in autism. **Psychiatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 32, p. 1-14, 2009.

BODNAR, R.J. Endogenous opiates and behavior: 2008. **Peptides**, New York, v. 30, p. 2432-2479, 2009.

BÖHLEN, P.; CASTILLO, F.; LING, N.; GUILLEMIN, R. An efficient procedure for the separation of peptides from amino acids and salts. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v. 16, p. 306-310, 1980.

BRANTL, V.; GRAMSCH, C.; LOTTSPEICH, F.; HENSCHEN, A.; JAEGER, K.; HERZ, A. Novel opioid peptides derived from mitochondrial cytochrome b: cytochrophins. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 111, p. 293-294, 1985.

BRANTL, V.; GRAMSCH, C.; LOTTSPEICH, F.; MERTZ, R.; JAEGER, K.; HERZ, A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 125, p. 309-310, 1986.

BRANTL, V.; TESCHEMACHER, A.; HENSCHEN, A.; LOTTSPEICH, F. Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). **Hoppe Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, Berlin, v. 360, n. 9, p. 1211-1216, 1979.

CAMPBELL, D.B.; BUIE, T.M.; WINTER, H.; BAUMAN, M.; SUTCLIFFE, J.S.; PERRIN, J.M.; LEVITT, P. Distinct genetic risk based on association of MET in families with co-occurring autism and gastrointestinal conditions. **Pediatrics**, Vermont, v. 123, n. 4, p. 1018-1024, 2009.

CASS, H.; GRINGRAS, J.; MARCH, J.; McKENDRICK, I.; O'HARE, A.E.; OWEN, L.; POLIN, C. Absence of urinary opioid peptides in children with autism. **Archives of Disease in Childhood**, London, v. 93, p. 745-750, 2008.

CHAKRABARTI, S.; FOMBONNE, E. Pervasive developmental disorders in preschool children: high prevalence confirmed. **The American Journal of Psychiatry**, Hanover, v. 162, p. 1133-1141, 2005.

CHRISTISON, G.W.; IVANY, K. Elimination diets in autism spectrum disorders: any wheat amidst the chaff. **Developmental and Behavioral Pediatrics**, London, v. 27, n. 2, p. 162-171, 2006.

CLARK, J.A.; LIU, L.; PRICE, M.; HERSH, B.; EDELSON, M.; PASTERNAK, G.W. Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and novel kappa 3 subtypes. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 25, p. 461-468, 1989.

COMI, A.M.; ZIMERMAN, A.W.; FRYE, V.H.; LAW, P.A.; PEEDEN, J.N: Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. **Journal of Child Neurology**, Littleton, v. 14, p. 388-394, 1999.

COON, J.J.; ZÜRBIG, P.; DAKNA, M.; DOMINICZAK, A.F.; DECRAMER, S.; FLISER, D.; FROMMBERGER, M.; GOLOVKO, I.; GOOD, D.M.; HERGET-ROSENTHAL, S.; JANKOWSKI, J.; JULIAN, B.A.; KELLMANN, M.; KOLCH, W.; MASSY, Z.; NOVAK, J.; ROSSING, K.; SCHANSTRA, J.P.; SCHIFFER, E.; THEODORESCU, D.; VANHOLDER, R.; WEISSINGER, E.M.; MISCHAK, H.; SCHMITT-KOPPLIN, P. CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics. **Proteomics Clinical Applications**, Weinheim, v. 2, p. 964-973, 2008.

CORNISH, E . A balanced approach towards healthy eating in autism. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, Oxford, v. 11, p. 501-509, 1998.

CROEN, L.A.; GREETHER, J.K.; YOSHIDA, C.K.; ODOULI, R.; WATER, J. Van de. Maternal autoimmune diseases, asthma and allergies, and childhood autism spectrum disorders: a case control study. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, Chicago, v. 159, p. 151-157, 2005.

DALTON, P.; DEACON, R.; BLAMIRE, A.; PIKE, M.; McKINLAY, I.; STEIN, J.; STYLES, P.; VINCENT, A. Maternal neuronal antibodies associated with autism and a language disorder. **Annals of Neurology**, New York, v. 53, p. 533-537, 2003.

D' EUFEMIA, P.D.; CELLI, M.; FINOCCHIARO, R.; PACIFICO, L.; VIOZZI, L.; ZACCAGNINI, M.; CARDI, E.; GIARDINI, O. Abnormal intestinal permeability in children with autism. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 85, p. 1076-1079, 1996.

DOHAN, F.C. Hypothesis: genes and neuroactive peptides from food as cause of schizophrenia. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, Amsterdam, v. 22, p. 535-548, 1980.

DYKENS, E.M.; SUTCLIFFE, J.S.; LEVITT, P. Autism and 15Q11-Q13 disorders: behavioral, genetic, and pathophysiological issues. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, New York, v. 1, p. 284-291, 2004.

EL-HODHOD, M.A.; NASSAR, M.F.; NASSAR, J.F.; EL-NAHAS, G.M.; GOMAA, S.M. Cow's milk protein elimination in autistic children: language, cognitive and behavioral outcome. **Egyptian Journal Pediatric Allergy Immunology**, Cairo, v. 4, p. 15-22, 2006.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **My pyramid food intake pattern calorie levels**, 2005. Disponível em: <<http://mypyramid.gov/>>. Acesso em: 10 novembro 2010.

FANCIULLI, G.; AZARA, E.; WOOD, T.D.; DELITALA, G.; MARCHETTI, M. Liquid chromatography-mass spectrometry assay for quantification of gluten exorphin B5 in cerebrospinal fluid. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 852, p. 485-490, 2007.

FERRAZ, P.G. Receptores e antagonistas opioides: revisão da classificação e propriedades dos receptores e seus dois principais antagonistas: naloxona e naltrexona. **Infanto - Revista de Neuropsiquiatria da Infância e Adolescência**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 106-111, 1999.

FIELD, D.; GARLAND, M.; WILLIAMS, K. Correlates of specific childhood feeding problems. **Journal of Paediatric Child Health**, Melbourne, v. 39, p. 299-304, 2003.

FIESBERG, R.M.; SLATER, B.; MARCHIONI, D.M.L.; MARTINI, L.A. Métodos de inquéritos alimentares. In _____. **Inquéritos alimentares: metodos e bases científicas**. São Paulo: Manole, 2005. p. 1-29.

FOLSTEIN, S.E.; ROSEN-SHEIDLEY, B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 2, n.12, p. 943-955, 2001.

FOLSTEIN, S.; RUTTER, M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. **The Journal of Child Psychology and Psychiatry**, Southampton, v. 18, n. 4, p. 297-321, 1977.

FUKUDOME, S.; YOSHIKAWA, M. Gluten exorphin C. A novel opioid peptide derived from wheat gluten. **Federation of European Biochemical Societies**, Oxford, v. 316, n. 1, p. 17-19, 1993.

_____. Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. **Federation of European Biochemical Societies**, Oxford, v. 296, n. 1, p. 107-111, 1992.

FURLANO, R.I.; ANTHONY, A.; DAY, R.; BROWN, A.; GARVEY, L.; THOMSON, M.A.; DAVIES, S.E.; BERELOWITZ, M.; FORBES, A.; WAKEFIELD, A.J.; WALKER-SMITH, J.A.; MUCH, S.H. Colonic CD 8 and $\gamma\delta$ T-cell infiltration whit epithelial damage in children with autism. **Journal of Pediatrics**, St Louis, v. 138, p. 366-372, 2001.

GADIA, C.A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N.T. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 80, (supl. 2), S83-S94, 2004.

GILGER, M.A.; REDEL, C.A. Autism and the gut. **Pediatrics**, Vermont, v. 124, n. 2, p. 796-798, 2009.

GILLBERG, C.; TERENIUS, L.; LÖNNERHOLM, G. Endorphin activity in childhood psychosis: spinal fluid in 24 cases. **Archives of General Psychiatry**, Chicago, v. 42, p. 780-783, 1985.

GOLDBERG, E. A. The link between gastroenterology and autism. **Gastroenterology Nursing**, Baltimore, v. 27, n. 1, p. 16-19, 2004.

GOLDBERG, I.E.; ROSSI, G.C.; LETCHWORTH, S.R.; MATHIS, J.P.; RYAN-MORO, J.; LEVENTHAL, L.; SU, W.; EMMEL, D.; BOLAN, E.A.; PASTERNAK, G.W. Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 286, n. 2, p.1007-1013, 1998.

GOODWIN, M.S.; COWEN, M.A.; GOODWIN, T.C. Malabsorption and cerebral function: a multivariate and comparative study of autistic children. **Journal of Autism and Childhood Schizophrenia**, New York, v. 1, n. 1, p. 48-62, 1971.

GOZZANI, J.L. Opioides e antagonistas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 1, p. 65-73, 1994.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 18, p. 163-166, 2007.

HEMMINGS, W.A. The entry into the brain of large molecules derived from dietary protein. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B - Biological Sciences**, London, v. 200, p. 175-192, 1978.

HERNDON, A.C.; DIGUISEPPI, C.; SUSAN, L.; JOHNSON, S.L.; LEIFERMAN, J.; REYNOLDS, A. Does nutritional intake differ between children with autism spectrum disorders and children with typical development? **Journal of Autism Developmental Disorders**, New York, v. 39, p. 212-222, 2009.

HILL, E.L.; FRITH, U. Understanding autism: insights from mind and brain philosophical transactions. **Proceedings of the Royal Society of London - Series B - Biological Sciences**, London, v. 358, p. 281-289, 2003.

HIRATA, H.; SONODA, S.; AGUI, S.; YOSHIDA, M.; OHINATA, K.; YOSHIKAWA, M. Rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from spinach rubisco, has anxiolytic effect via activating σ_1 and dopamine D_1 receptors. **Peptides**, New York, v. 28, p. 1998-2003, 2007.

HOLE, K.; BERGSLIEN, A.A.; JØRGENSEN, H.; BERGE, O.G.; REICHELT, K.L.; TRYGSTAD, O.E. A peptide containing fraction from schizophrenia which stimulates opiate receptors and inhibits dopamine uptake. **Neuroscience**, Oxford, v. 4, 1139-1147, 1979.

HORVATH, K.; PERMAN, J.A. Autism and gastrointestinal symptoms. **Pediatric Gastroenterology**, New York, v. 4, p. 251-258, 2002.

HUNTER, L.C.; O'HARE, A.; HERRON, W.J.; FISHER, L.A.; JONES, G.E. Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. **Developmental Medicine and Child Neurology**, London, v. 45, p. 121-128, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes: **Applications in dietary assessment**. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

JANECKA, A.; FICHNA, J.; JANECKI, T. Opioid receptors and their ligands. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 4, p. 1-17, 2004.

JARMOŁOWSKA, B.; BIELIKOWICZ, K.; IWAN, M.; SIDOR, K.; KOSTYRA, E.; KACZMARSKI, M. Serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5) in breast-fed infants with symptoms of allergy. **Peptides**, New York, v. 28, p. 678-682, 2007.

JOHNSON, C.R.; HANDEN, B.L.; COSTA, M.; SACCO, K. Eating habits and dietary status in young children with autism. **Journal of Developmental and Physical Disabilities**, New York, v. 20, p. 437-448, 2008.

JYONOUCHI, H.; GENG, L.; RUBY, A.; ZIMMERMAN-BIER, B. Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. **Neuropsychobiology**, New York, v. 51, p.77-85, 2005.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; ITOKAZU, N. Innate immunity associate with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. **Neuropsychobiology**, New York, v. 46, p. 76-84, 2002.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.N.; LE, H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 120, p. 170-179, 2001.

KANE, B.E.; SVENSSON, B.; FERGUSON, D.M. Molecular recognition of opioid receptor ligands. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Arlington, v. 8, n. 1, p. 126-137, 2006.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous Child**, New York, v. 2, p. 217-250, 1943.

KITTS, D.D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 9, p. 1309-1323, 2003.

KLIN, A. Autismo e Asperger: uma visão geral. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 28, (supl. 1), S3-S11, 2006.

KNIVSBERG, A.; REICHELT, K.L.; HØIEN, T. A randomized, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, v. 5, p. 251-261, 2002.

KNIVSBERG, A.M.; REICHELT, K.L.; HØIEN, T.; NØDLAND, M. Effect of a dietary intervention on autistic behavior. **Focus on Autism and Other Developmental Disabilities**, Austin, v.18, n. 4, p. 248-257, 2003.

KONERU, A.; SATYANARAYANA, S.; RIZWAN, S. Endogenous opioids: their physiological role and receptors. **Global Journal of Pharmacology**, Babol, v. 3, n. 3, p. 149-153, 2009.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, p. 945-960, 2006.

KREEK, M.J.; LAFORGE, K.S. Stress responsivity, addiction, and a functional variant of the human Mu-opioid receptor gene. **Molecular Interventions**, Bethesda, v.7, n. 2, p. 74-78, 2007.

LEONARD, H.; DIXON, G.; WHITEHOUSE, A.J.O.; BOURKE, J.; AIBERTI, K.; NASSAR, N.; BOWER, C.; GLASSON, E.J. Unpacking the complex nature of the autism epidemic. **Research in Autism Spectrum Disorders**, Amsterdam, v. 4, p. 548-554, 2010.

LEVY, S.E.; SOUDERS, M.C.; ITTENBACH, R.F.; GIARELLI, E.; MULBERG, A.E.; PINTO-MARTIN, J.A. Relationship of dietary intake to gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders. **Biological Psychiatry**, New York, v. 61, p. 492-497, 2007.

LIGHTDALE, J.R.; SIEGEL, B.; HEIMAN, M.B. Gastrointestinal symptoms in autistic children. **Clinical Perspect in Gastroenterol**, Yale, v.1, p. 56-58, 2001.

LINDSTRØM, L.H.; NYBERG, F.; TERENIUS, L.; BAUER, K.; BESEV, G.; GUNNE, L.M.; LYRENÁS, S.; WILLDECK-LUND, G.; LUNDBERG, B. CSF and plasma β -casomorphin like opioid peptides in postpartum psychosis. **Psychiatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 141, p. 1059-1066, 1984.

LIU, Y.; HEIBERG, T.; REICHELT, K.L. Towards a possible aetiology for depressions? **Behavioral and Brain Functions**, Oslo, v. 3, n. 47, p. 1-7, 2007.

LUCARELLI, S.; FREDIANI, T.; ZINGONI, A.M.; FERRUZZI, F.; GIARDINI, O.; QUITIERI, F.; BARTATO, M.; D' EUFEMIA, P.; CARDI, E. Food allergy and infantile autism. **Panminerva Medica**, Torino, v. 37, p. 137-141, 1995.

LUKENS, C.T.; LINSCHIED, T.R. Development and validation of an inventory to assess mealtime behavior problems in children with autism. **Journal of Autism Developmental Disorders**, New York, v. 38, p. 342-352, 2008.

MALSON, L. **Les enfants sauvages**. Paris. Union Générale d Editions, 1964.

MARKLOVA, E.; MAKOVÍČKOVÁ, H.; KRÁKOROVÁ, I. Screening for defects in tryptophan metabolism. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 870, p.289-293, 2000.

McDONALD, J.; LAMBERT, D.G. Opioid receptors. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 22-25, 2005.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, p. 363-373, 1998.

MILLS, M.J.; SAVERY, D.; SHATTOCK, P.E. Rapid analysis of low levels of indolylyl-3-acrolylglycine in human urine by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 712, p. 51-58, 1998.

MÖLLER, N.P.; SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 47, p.171-182, 2008.

MULLOY, A.; LANG, R.; O'REILLY, M.; SIGAFOOS, J.; LANCIONI, G.; RISPOLI, M. Gluten-free and casein-free diets in the treatment of autism spectrum disorders: a systematic review. **Research in Autism Spectrum Disorders**, Amsterdam, v. 4, p. 328-339, 2010.

MUNK, D.D.; REPP, A.C. Behavioral assessment of feeding problems of individuals with severe disabilities. **Journal of Applied Behavior Analysis**, Ann Arbor, v. 27, n. 2, p. 241-250, 1994.

NEIVA-SILVA, L.; KOLLER, S.H. O uso da fotografia na pesquisa em psicologia. **Estudos de Psicologia**, Natal, v. 7, n. 2, p. 237-250, 2002.

NICOLOV, R.; JONKER, J.; SCAHILL, L. Autismo: tratamentos psicofarmacológicos e áreas de interesse para desenvolvimentos futuros. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 28, (supl. 1), S39-S46, 2006.

NYBERG, F.; LIEBERMAN, R.; LINDSTRØM, L.H.; LYRENAES, S.; KOCH, G.; TERENIUS, L. Immunoreactive β -casomorphin-8 in cerebrospinal fluid from pregnant and lactating women: correlation with plasma levels. **The Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 68, p. 283-289, 1989.

ODELL, D.; MACIULIS, A.; CUTLER, A.; WARREN, L.; McMAHON, W.M.; COON, H.; STUBBS, G.; HENLEY, K.; TORRES, A. Confirmation of the association of the C4B null allele in autism. **Human Immunology**, New York, v. 66, n. 2, p. 140-145, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde (1992)**: CID - 10. 10.ed. São Paulo, 2000. p. 361-362.

PAGE, T. Metabolic approaches to the treatment of autism spectrum disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, New York, v. 30, n. 5, p. 463-469, 2000.

PANKSEPP, J. A. Neurochemical theory of autism. **Trends Neurosciences**, New York, v. 2, p. 174-177, 1979.

PANKSEPP, J.; NORMANSELL, L.; SIVILY, S.; ROSSI, J.; ZOLOVICK, A.J. Casomorphins reduce separation distress in chickens. **Peptides**, New York, v. 5, p. 829-831, 1978.

PARDO-GOVEA, T.; SOLÍS-ÁÑEZ, E. Aspectos inmunogenéticos del autismo. Revisión. **Investigación Clínica**, Maracaibo, v. 50, n. 3, p. 393-406, 2009.

PARRACHO, H.M.R.T.; BINGHAM, M.O.; GIBSON, G.R.; McCARTNEY, A.L. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. **Journal Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 54, p. 987-991, 2005.

PASTERNAK, G.W.; STANDIFER, K.M. Mapping of opioid receptors using antisense oligodeoxynucleotides: correlating their molecular biology and pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 16, p. 344-350, 1995.

PHETRASUWAN, S.; MILES, M.S.; MESIBOV, G.B. Defining autism spectrum disorders. **Journal for Specialists in Pediatric Nursing**, Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 206-209, 2009.

PÓO-ARGÜELLES, P.; ARIAS, A.; VILASECA, M.A.; RIBES, A.; ARTUCH, R.; SANS-FITO, A.; MORENO, A.; JAKOBS, C.; SALOMONS, G. X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, Lancaster, v. 29, p. 220-223, 2006.

PORTOGHESE, P.S.; SULTANA, M.; NELSON, W.L.; KLEIN, P.; TAKEMORI, A.E. Delta opioid antagonist activity and binding studies of regioisomeric isothiocyanate derivatives of naltrindole: evidence for delta receptor subtypes. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 35, p. 4086-4091, 1992.

RAITEN, D. J.; MASSARO, T. Perspectives on the nutritional ecology of autistic children. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, New York, v. 16, p.133-143, 1986.

REICHELT, A.K.L.; KNIVSBERG, A.M. Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? **Nutritional Neuroscience**, London, v. 6, n. 1, p. 19-28, 2003.

_____. The possibility of a gut-to-brain connection in autism. **Annals of Clinical Psychiatry**, New York, v. 21, n. 4, p. 205-211, 2009.

REICHELT, K.L.; KNIVSBERG, A.M.; LIND, G.; NODLAND, M. Probable etiology and possible treatment of childhood autism. **Brain Dysfunction**, Rome, v. 4, p. 308-319, 1991.

REICHELT, W.H.; EK, J.; STENSRUD, M.; REICHELT, K. L. Peptide excretion in celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 26, p. 305-309, 1998.

REICHELT, W.H.; KNIVSBERG, A.M.; NODLAND, M.; STENSRUD, M.; REICHELT, K.L. Urinary peptide levels and patterns in autistic children from seven countries, and the effect of dietary intervention after 4 years. **Developmental Brain Dysfunction**, New York, v.10, p. 44-55, 1997.

SAS. **System for statistical analysis**. SAS 9.2. Cary: 2003.

SCHOPLER, E.; REICHLER, R.; RENNER, B.R. **The childhood autism rating scale (CARS)**. Los Angeles: Western Psychological Services, 1998.

SCHRECK, K.A.; WILLIAMS, K.; SMITH, A. Comparison of eating behaviors between children with and without autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, New York, v. 34, n. 4, p. 433-438, 2004.

SEIM, A.R.; REICHELT, K.L. Theory of psychiatric pathogenesis: unifying observations on phenylketonuria, autism, schizophrenia and postpartum psychosis. **Medical Hypotheses**, Penrith, v. 45, p. 498-502, 1995.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Varela, 1996. 517p.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 91, n. 4, p. 914-931, 2008.

SHANAHAN, M.R.; VENTURINI, A.J.; DAISS, J.L.; FRIEDMAN, A.E. **European Patent Application** Nº 99304636.6 EP 0969015, A2, 2000.

SHATTOCK, P.; KENNEDY, A.; ROWELL, F.; BERNEY, T.P. Role of neuropeptides in autism and their relationships with classical neurotransmitters. **Brain Dysfunction**, Rome, v. 3, n. 2, p. 328-345, 1990.

SILVA, M.; MULICK, A. Diagnosticando o transtorno autista: aspectos fundamentais e considerações práticas. **Psicologia Ciência e Profissão**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 116-131, 2009.

SILVA, S.V.; MALCATA, F.X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 15, p. 1-15, 2005.

SMITH, R.A.; FARNWORTH, H.; WRIGHT, B.; ALLGAR, V. Are there more bowel symptoms in children with autism compared to normal children and children with other developmental and neurological disorders? **Autism**, Stanford, v. 13, n. 4, p. 343-355, 2009.

SOFTWARE de avaliação nutricional. DietWin clínico [programa de computador]. Versão 3.0. Porto Alegre: Brubins Comércio de Alimentos e Supergelados, 2002.

SOLAAS, K.M.; SKJELDAL, O.; GARDNER, M.L.G.; KASE, B.F.; REICHEL, K.L. Urinary peptides in Rett Syndrome. **Autism**, Stanford, v. 6, n. 3, p. 315-329, 2002.

STUART, C.A.; TWISELTON, R.; NICHOLAS, M.; HIDE, D.W. Passage of cow's milk protein in breast milk. **Clinical Allergy**, Oxford, v.14, p. 533-535, 1984.

SUN, Z.; CADE, J.R. A peptide found in schizophrenia and autism causes behavioral changes in rats. **Autism**, Stanford, v. 3, p. 85-95, 1999.

SUN, Z.; CADE, J.R.; FREGLY, M.J.; PRIVETTE, R.M. β -Casomorphin induces Fos-like immunoreactivity in discrete brain regions relevant to schizophrenia and autism. **Autism**, Stanford, v. 3, p. 67-83, 1999.

SUN, Z.; ZHANG, Z.; WANG, X.; CADE, R.; ELMIR, Z.; FREGLY, M. Relation of β -casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. **Peptides**, New York, v. 24, p. 937-943, 2003.

TESCHEMACHER, H. Atypical opioid peptides. In: AKIL, H.; SIMON, E.J. **Opioids I**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 499-528.

TIERNEY, E.; NWOKORO, N.A.; PORTER, F.D.; FREUND, L.S.; GHUMAN, J.K.; KELLEY, R.I. Behavior phenotype in the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 98, n. 2, p. 191-200, 2001.

TORRENTE, F.; ASHWOOD, P.; DAY, R.; MACHADO, N.; FURLANO, R.I.; ANTHONY, A.; DAVIES, S.E.; WAKEFIELD, A.J.; THOMSON, M.A.; WALKER-SMITH, J.A.; MURCH, S.H. Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v. 7, p. 375-382, 2002.

TRESCOT, A.M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANS-HANSEN, H. Opioid pharmacology. **Pain Physician**, Paducah, v. 11, S133-S153, 2008.

TRIGO, J.M.; MARTIN-GARCÍA, E.; BERRENDERO, F.; ROBLEDÓ, P.; MALDONADO, R. The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. **Drug and Alcohol Dependence**, Lausanne, v. 108, p. 183-194, 2010.

TRONCONE, R.; SCARCELLO, A.; DONATIELLO, A.; CANNATARO, P.; TARABUSCO, A.; AURICCHIO, S. Passage of gliadin into human breast milk. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 76, p. 453-456, 1987.

VADASZ, E. Um novo olhar sobre o autism. **Revista Época**, São Paulo, n. 473, p.76 - 85, 2007.

VALICENTI-McDERMOTT, M.D.; McVICAR, K.; COHEN, H.J.; WERSHIL, B.K.; SHINNAR, S. Gastrointestinal symptoms in children with an autism spectrum disorder and language regression. **Pediatric Neurology**, Chippewa Falls, v. 39, n. 6, p. 392-398, 2008.

VALICENTI-McDERMOTT, M.; McVICAR, K.; RAPIN, I.; WERSHIL, B.K.; COHEN, H.J.; SHINNAR, S. Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, Baltimore, v. 27, (supl. 2), S128-S136, 2006.

VERHOEVEN, N.M.; SALOMONS, G.S.; JAKOBS, C. Laboratory diagnosis of defects of creatine biosynthesis and transport. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 361, p. 1-9, 2005.

VOJDANI, A.; CAMPBELL, A.W.; ANYANWU, E.; KASHANIAN, A.; BOCK, K.; VOJDANI, E. Antibodies to neuron-specific antigens in children with autism: possible cross-reaction with encephalitogenic proteins from mild. *Chlamydia pneumoniae* and Streptococcus group A. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 129, p. 168-177, 2002.

VOJDANI, A.; O'BRYAN, T.; GREEN, J.A.; McCANDLESS, J.; WOELLER, K.N.; VOJDANI, E.; NOURIAN, A.A.; COOPER, E.L. Immune response to dietary proteins, gliadin and cerebellar peptides in children with autism. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 151-161, 2004a.

VOJDANI, A.; BAZARGAN, M.; VOJDANI, E.; SAMADI, J.; NOURIAN, A.A.; EGHBALIEH, N.; COOPER, E.L. Heat shock protein and gliadin peptide promote development of peptidase antibodies in children with autism and patients with autoimmune disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Bimonthly, v. 11, p. 515-524, 2004b.

WAKEFIELD, A.J.; MUCH, S.H.; ANTHONY, A.; THOMPSON, M.A.; MONTGOMERY, S.M.; DAVIES, S.E.; O'LEARY, J.J.; BERELWITZ, M.; WALKER-SMITH, J.A. Enterocolitis in children with developmental disorders. **American Journal of Gastroenterology**, Boston, v. 95, p. 2285-2295, 2000.

WAKEFIELD, A.J.; PULESTON, J.M.; MONTGOMERY, S.M.; ANTHONY, A.; O'LEARY, J.J.; MUCH, S.H. Review article: the concept of entero-colonic encephalopathy, autism and opioid receptor ligands. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 16, p. 663-674, 2002.

WALKER-SMITH, J.; ANDREWS, J. Alpha-1-antitrypsin, autism, and coeliac disease. **Lancet**, London, v. 2, n. 7782, p. 883-884, 1972.

WHITE, J.F. Intestinal pathophysiology in autism. Minireview. **Experimental Biology Medical**, Maywood, v. 228, p. 639-649, 2003.

WHITELEY, O.; HARACOPOS, D.; KNIVSBERG, A.M.; REICHELT, K.L.; SARAH, P.; JACOBSEN, S.J.; SEIM, A.; PEDERSEN, L.; SCHONDEL, M.; SHATTOCK, P. The ScanBrit randomised, controlled, singleblind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 87-100, 2010.

WHITELEY, P.; WARING, R.; WILLIAMS, L.; KLOVRZA, L.; NOLAN, F.; SMITH, S.; FARROW, M.; DODOU, K.; LOUGH, W.J.; SHATTOCK, P. Spot urinary creatinine excretion in pervasive developmental disorders. **Pediatrics International**, Carlton, v. 48, p. 292-297, 2006.

WINSBERG, B.G.; SIVERD, J.; CASTELLS, S.; HURWIRC, M.; PEREL, I.M. Estimation of monoamine and cyclic- AMP turn over and amino acid concentrations of spinal fluid in autistic children. **Neuropediatrics**, Stuttgart, v. 11, n. 3, p. 250-255, 1980.

WOLFF, S. The history of autism. **European Child and Adolescent Psychiatric**, Darmstadt, v. 13, p. 201-208, 2004.

ANEXOS

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRO E ESCLARECIDO – TCLE

Vimos por este pedir seu consentimento para que o portador da síndrome autista que está sob sua responsabilidade participe da primeira etapa da pesquisa “Impacto de intervenções nutricionais no tratamento da síndrome autista”.

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

O objetivo deste estudo é estabelecer uma correlação entre consumo de alimentos presentes na dieta e seu efeito no comportamento e no quadro clínico do autista.

A participação do autista nesta pesquisa consistirá em fazer exame de urina, avaliação do comportamento segundo método psicopedagógico adotado pela clínica e levantamento de hábito alimentar por meio de questionário direcionado aos pais e responsáveis.

Para o exame de urina, a primeira urina do dia será coletada em um frasco, depois de fechado deverá ser colocado em saco plástico e guardado no congelador da geladeira da casa do participante. O pai ou responsável fará a coleta da urina e para que seja feita de forma adequada receberá treinamento. No mesmo dia a pesquisadora e a coordenadora administrativa da clínica irá buscar a urina congelada nas casas. As amostras serão colocadas em uma caixa de isopor com gelo seco e serão levadas para a pesquisadora para o laboratório de Bromatologia do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, onde será mantida congelada.

A urina será descongelada e 5mL será enviado a um laboratório terceirizado para realizar o exame de concentração de creatinina. A urina restante será filtrada e liofilizada no laboratório de Bromatologia e em seguida enviada para o laboratório de

Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan em São Paulo onde será feita a análise de peptídeos opioides na urina. O frasco para a coleta da urina será doado pelos pesquisadores.

O exame que vai avaliar o comportamento dos participantes da pesquisa será feito por psicólogo da clínica onde fazem o tratamento. Este teste é baseado em observação clínica.

O exame de urina, o levantamento de consumo de alimentos e a avaliação psicológica serão feitos apenas uma vez.

A pesquisa não apresenta risco aos participantes, pois o exame de urina, o levantamento de hábito alimentar e a avaliação psicopedagógica não são procedimentos invasivos.

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

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

Os benefícios relacionados com a participação do autismo é a possibilidade de identificar fatores relacionados à dieta que possam contribuir para o agravamento dos sintomas comportamentais e a partir desta constatação criar um tratamento complementar baseado em uma dieta adequada.

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

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

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

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

DADOS DO PESQUISADOR PRINCIPAL.**Profª Drª Jocelyne Mastrodi Salgado**

Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Av: Pádua Dias nº 11, caixa postal:9, Cep: 13418-900 Piracicaba-SP-BRASIL. Telefone (19) 3429-4118/ 3429-4276 ou Telefone: (19) 91-909026

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação do autista que está sob minha responsabilidade e concordo com a sua participação na pesquisa.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo CEP ESALQ, localizado na Av: Pádua Dias nº11, caixa postal:9, Cep: 13418-900 Piracicaba-SP-BRASIL.

Piracicaba, ___ de _____ de 20

Pai ou responsável pelo participante*

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRO E ESCLARECIDO – TCLE

Vimos por este convidá-lo a participar da pesquisa “Impacto de intervenções nutricionais no tratamento da síndrome autista”.

Você foi escolhido para participar da pesquisa por ser parente do autista que irá participar deste projeto. Sua participação não é obrigatória e qualquer momento você pode desistir. Sua recusa não trará nenhum prejuízo a você ou ao autista tão bem quanto a sua relação com o pesquisador ou com a instituição. O tratamento na clínica em hipótese alguma será prejudicado ou suspenso.

O objetivo deste estudo é estabelecer uma correlação entre o consumo de alimentos presentes na dieta e seu efeito no comportamento e no quadro clínico do autista.

A sua participação consistirá em fazer o exame de urina.

Para este exame, a primeira urina do dia será coletada em um frasco, depois de fechado deverá ser colocado em saco plástico e guardado no congelador da geladeira da casa onde mora. A coleta da urina deve ser feita pelo próprio participante e para que seja feita de forma adequada receberá treinamento. No mesmo dia a pesquisadora e a coordenadora administrativa da clínica irá buscar a urina congelada nas casas. As amostras serão colocadas em uma caixa de isopor com gelo seco e serão levadas para a pesquisadora para o laboratório de Bromatologia do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, onde será mantida congelada.

A urina será descongelada e 5mL será enviado a um laboratório terceirizado para realizar o exame de concentração de creatinina. A urina restante será filtrada e liofilizada no laboratório de Bromatologia e em seguida enviada para o laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan em São Paulo onde será feita a análise de peptídeos opioides na urina. O frasco para a coleta da urina será doado pelos pesquisadores. O exame de urina será feito apenas uma vez.

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

Os benefícios com a sua participação é a possibilidade de auxiliar na identificação de fatores relacionados à dieta que possam contribuir para o agravamento dos sintomas comportamentais e a partir desta constatação criar um tratamento complementar baseado em uma dieta adequada para ele.

O participante não terá nenhuma despesa para participar da pesquisa, todos os exames serão pagos pelo projeto.

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

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

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

DADOS DO PESQUISADOR PRINCIPAL.

Profª Drª Jocelyne Mastrodi Salgado

Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Av: Pádua Dias nº 11, caixa postal:9, Cep: 13418-900 Piracicaba-SP-BRASIL. Telefone (19) 3429-4118/ 3429-4276 ou Telefone: (19) 91909026

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação do autista que está sob minha responsabilidade e concordo com a sua participação na pesquisa.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo CEP ESALQ, localizado na Av: Pádua Dias nº11, caixa postal:9, Cep: 13418-900 Piracicaba-SP-BRASIL.

Piracicaba, ____ de _____ de 20

Participante

ANEXO C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Vimos por este pedir seu consentimento para fotografar o portador da síndrome autista que está sob sua responsabilidade e que participe da pesquisa “Impacto de intervenções nutricionais no tratamento da síndrome autista” durante a refeição que é realizada na instituição que recebe o tratamento psicoeducacional.

A qualquer momento você pode desistir e retirar seu consentimento para fotografá-lo. Sua recusa não trará nenhum prejuízo ao autista e tão quanto sua relação com o pesquisador ou com a instituição. O tratamento na clínica em hipótese alguma será prejudicado ou suspenso.

As fotografias obtidas serão digitais e utilizadas apenas para estudo e não serão divulgadas em meio de comunicação ou utilizadas para outros fins. Essas serão gravadas em um CD e guardadas em arquivo confidencial sob cuidados dos pesquisadores. Apenas os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso às imagens. As fotografias serão utilizadas na tese de mestrado da aluna Nádia Isaac da Silva e impressas em posteres de resumos dos resultados da pesquisa apresentados em eventos científicos. A Dissertação de Mestrado da aluna Nádia Isaac da Silva estará disponível na Internet, pois será inclusa no banco de dados online da biblioteca da Universidade de São Paula.

O banco de dados é de livre acesso, ou seja, qualquer pessoa pode ter acesso a Dissertação e por essa razão existe o risco das fotografias serem utilizadas por outro pesquisador, profissional ou estudante da área e também a exposição das mesmas em outros veículos de comunicação.

A integridade e anonimato dos autistas fotografados serão preservados, os rostos serão tarjados e disfigurados de forma não promover a identificação dos autistas e consequentemente expo-los a situações de constrangimento. Outra medida é de que as fotos serão tiradas de perfil.

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

DADOS DO PESQUISADOR PRINCIPAL.
Profª Drª Jocelim Mastrodi Salgado

Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Av: Pádua Dias nº 11, caixa postal:9, Cep: 13418-900 Piracicaba-SP-BRASIL. Telefone (19) 3429-4118/ 3429-4276 ou Telefone: (19) 91909026

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação do autista que está sob minha responsabilidade e concordo com a sua participação na pesquisa.

Piracicaba, ____ de _____ de 20

Pai ou responsável pelo Participante*