

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIA CAROLINA MARCIANO CAMPOS DE SOUZA

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO USO DE VITAMINA D NA
GESTAÇÃO E DO ÔMEGA 3 NA PROLE EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

CRICIÚMA, JUNHO DE 2025

MARIA CAROLINA MARCIANO CAMPOS DE SOUZA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO USO DE VITAMINA D NA GESTAÇÃO
E DO ÔMEGA 3 NA PROLE EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinara Ludvig
Gonçalves

CRICIÚMA, JUNHO DE 2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S729e Souza, Maria Carolina Marciano Campos de.

Efeitos da associação do uso de vitamina D na gestação e do ômega 3 na prole em um modelo experimental de transtorno do espectro autista / Maria Carolina Marciano Campos de Souza. - 2025.
91 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

1. Vitamina D - Efeito fisiológico. 2. Ácidos Graxos Ômega-3 - Efeito fisiológico. 3. Grávidas - Aspectos nutricionais. 4. Cuidado pós-natal. 5. Transtornos do espectro autista. 6. Transtornos do neurodesenvolvimento. I. Título.

CDD 23. ed. 613.28

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

No dia 23 (vinte e três) do mês de junho de 2025, às 14 (quatorze) horas, no Bloco XXI-A/Sala 207, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: “EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO USO DE VITAMINA D NA GESTAÇÃO E DO ÔMEGA 3 NA PROLE EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA”, da candidata Maria Carolina Marciano Campos de Souza. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): Dra. Fabricia Cardoso Petronilho (Membro Relator – UNESC), Dr. Eduardo Pacheco Rico (Membro Interno – UNESC), Dra. Cristiane Damiani Tomasi (Membro Externo – UNESC) e Dra. Gislaine Tezza Rezin (Membro Externo – UNISUL). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado

Trabalho não aprovado

Observações:

Fazer os ajustes conforme comentado pela banca, em específico os ajustes nos resultados e discussão.

Criciúma, SC, 23 de junho de 2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Data: 30/06/2025 12:39:19-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente
gov.br EDUARDO PACHECO RICO
Data: 30/06/2025 12:33:03-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente
gov.br CRISTIANE DAMIANI TOMASI
Data: 30/06/2025 12:30:41-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Profa. Dra. CRISTIANE DAMIANI TOMASI
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente
gov.br GISLAINE TEZZA REZIN
Data: 30/06/2025 11:24:38-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Profa. Dra. GISLAINE TEZZA REZIN
Membro Externo – UNISUL

Documento assinado digitalmente
gov.br CINARA LUDVIG GONÇALVES
Data: 30/06/2025 13:13:29-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Profa. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSIANE BUDNI
Data: 02/07/2025 15:00:58-0300
Verifique em <https://validar.br.gov.br>

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Coordenadora Titular do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

Esta tese foi elaborada seguindo estilo ABNT, com adaptações especificadas na Resolução número 05/2024 do Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Pesquisa em Autismo e Neurodesenvolvimento, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico esta tese aos meus queridos pais Dolor (em memória) e Liliane por todo amor e dedicação durante toda a minha vida. Ao meu pai, pelo exemplo de ser humano, por toda a sua honestidade, caráter, advogado admirável, minha calma. Á minha mãe, exemplo de fé e ternura, por ser minha maior incentivadora, por me mostrar que sou capaz de vencer todos os obstáculos, sou extremamente grata pelo amor dispensados a mim e cuidado com as meninas na minha ausência.

Ao meu esposo Leandro pelo amor, confiança e paciência até a conclusão desta tese. Obrigada pelos momentos de descontração tão necessários ao longo desses anos.

Ás minhas pequenas, Alice e Elisa, por serem a razão do meu existir, a força para eu enfrentar os momentos de luta e as minhas fontes de felicidade, cada gesto de carinho e cada sorriso foram meus combustíveis diários de energia. Amo vocês infinitamente.

Aos meus irmãos, Flávio Henrique e Marcos Vinícius, obrigada pela amizade incondicional e pelo incentivo para a concretização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele esta jornada não seria cumprida.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Cinara Ludvig Gonçalves, por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida durante todo o período do doutorado, por confiar em meu trabalho e acreditar no meu potencial, pelas oportunidades de crescimento acadêmico e profissional. Obrigada por ser sempre calma, meiga e serena nesses longos anos.

Aos amigos do LAND que se tornaram uma segunda família.

À Edimara, grande amiga e incentivadora, meu braço direito no consultório. Sem a sua organização eu não conseguiria me ausentar tanto tempo dos meus pacientes.

À Roselaine, que além de cuidar do meu lar com tanto zelo, cuidou das preciosas Alice e Elisa com muito amor na minha ausência nesses 4 anos que tiver que viajar para Criciúma-SC.

Aos pais dos meus queridos pacientes, que confiam no meu conhecimento e que também foram fortes incentivadores desse sonho.

Aos amigos de caminhada, que deixaram a jornada até Criciúma mais leve.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, por oferecer um excelente programa de pós-graduação, dando suporte, condições estruturais e oportunidades de aprimoramento.

Agradeço à Universidade de Rio Verde por me apoiar como docente e por permitir através dessa parceria um ensino de qualidade.

Cada uma dessas contribuições foi um elemento fundamental para a conclusão deste desafio, por isso expressei minha eterna gratidão.

“O autismo não se expressa em palavras, mas nas cores vibrantes de uma mente única. Precisamos aprender a acolher essas nuances e descobrir o brilho interior que está oculto. Não é algo que precise ser consertado, mas um espectro da humanidade que deve ser compreendido, celebrado e valorizado”.

(Maria Carolina Marciano Campos de Souza)

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado por prejuízos na interação social, comunicação verbal e não verbal, além de comportamentos restritos, repetitivos e estereotipados. Estudos sugerem que a deficiência de vitamina D (Vit.) durante a gestação e lactação pode estar associada ao risco aumentado de TEA. Além disso, a suplementação com ômega-3 tem sido relacionada à melhora de aspectos comportamentais e cognitivos nesses indivíduos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com Vit.D durante a gestação e do ômega-3 (ω -3) no período pós-natal em um modelo experimental de TEA induzido por ácido valpróico (VPA). Após a confirmação da gravidez (presença de espermatozoides na vagina), as ratas prenhes receberam gelatina suplementada com Vit.D (500 UI/dia) ou gelatina controle, do dia gestacional (DG) 1 ao 21. No DG 12,5, as fêmeas de cada grupo foram subdivididas e receberam, por via intraperitoneal, uma dose única de VPA (600 mg/kg) ou solução salina (SAL). Após o nascimento, os filhotes foram alocados em subgrupos que receberam tratamento com ω -3, por gavagem, do dia pós-natal (DPN) 14 ao 34. O delineamento experimental resultou em oito grupos: 1) SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.); 2) SAL + Gelatina + ω -3 (pós-gest.); 3) SAL + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.); 4) SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.); 5) VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.); 6) VPA + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.); 7) VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.); 8) VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.). As proles foram pesadas no DPN 9 e entre os DPN 14 e 34, e submetidas aos testes comportamentais de busca pelo ninho (DPN 10), geotaxia negativa (DPN 14), campo aberto e teste das três câmaras (ambos no DPN 35). No DPN 21, as proles foram desmamadas e as matrizes eutanasiadas. Após os testes comportamentais, os filhotes também foram eutanasiados. O sangue foi coletado, e os encéfalos foram dissecados em cerebelo e córtex posterior para análise bioquímica dos seguintes parâmetros: estresse oxidativo (oxidação de DCFH-DA, conteúdo de sulfidrila, atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase); níveis de TNF no soro e córtex posterior, e neurotrofinas (BDNF e NGF) no córtex posterior. Os resultados mostraram que a exposição ao VPA durante a gestação não resultou em atrasos no neurodesenvolvimento (maior tempo para encontrar o ninho e realizar a tarefa de geotaxia negativa), déficits sociais e redução do comportamento exploratório. Além disso, o VPA reduziu os níveis séricos de 25(OH)D nas matrizes, induziu dano oxidativo e alterou a atividade de enzimas antioxidantes no córtex posterior e cerebelo. A suplementação com vitamina D, isoladamente ou combinada ao ω -3, foi capaz de atenuar esses efeitos, promovendo aumento nos níveis séricos de 25(OH)D, melhora no neurodesenvolvimento, na sociabilidade, na atividade exploratória, na redução do dano oxidativo e na regulação das enzimas antioxidantes. Conclui-se que a suplementação com vitamina D atenuou de modo significativo os efeitos deletérios do VPA, embora não tenha revertido completamente o fenótipo autista. A associação entre vitamina D na gestação e ω -3 no período pós-natal não potencializa os efeitos na prevenção de danos associados ao TEA em modelo experimental.

Palavras-chave: Neurodesenvolvimento; suplementação; estresse oxidativo; comportamento.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impairments in social interaction, verbal and non-verbal communication, and by restricted, repetitive, and stereotyped behaviors. Studies suggest that vitamin D (Vit. D) deficiency during pregnancy and lactation may be associated with an increased risk of ASD. In addition, omega-3 supplementation has been linked to improvements in behavioral and cognitive aspects in these individuals. The aim of the present study was to evaluate the effects of Vit. D supplementation during pregnancy and omega-3 (ω -3) in the postnatal period in an experimental model of ASD induced by valproic acid (VPA). After confirmation of pregnancy (presence of spermatozoa in the vagina), pregnant rats received gelatin supplemented with Vit. D (500 IU/day) or control gelatin, from gestational day (GD) 1 to 21. On GD 12.5, females from each group were subdivided and received a single intraperitoneal dose of VPA (600 mg/kg) or saline solution (SAL). After birth, the offspring were allocated into subgroups that received ω -3 treatment by gavage from postnatal day (PND) 14 to 34. The experimental design resulted in eight groups: 1) SAL + Gelatin (gest.) + Oil (post-gest.); 2) SAL + Gelatin + ω -3 (post-gest.); 3) SAL + Vit.D (gest.) + Oil (post-gest.); 4) SAL + Vit.D (gest.) + ω -3 (post-gest.); 5) VPA + Gelatin (gest.) + Oil (post-gest.); 6) VPA + Gelatin (gest.) + ω -3 (post-gest.); 7) VPA + Vit.D (gest.) + Oil (post-gest.); 8) VPA + Vit.D (gest.) + ω -3 (post-gest.). The offspring were weighed on PND 9 and between PND 14 and 34, and underwent the following behavioral tests: nest-seeking test (PND 10), negative geotaxis (PND 14), open field, and three-chamber social interaction test (both on PND 35). On PND 21, offspring were weaned, and dams were euthanized. After the behavioral tests, the offspring were also euthanized. Blood was collected, and brains were dissected into cerebellum and posterior cortex for biochemical analysis of the following parameters: oxidative stress (DCFH-DA oxidation, sulfhydryl content, superoxide dismutase and catalase enzyme activities); TNF levels in serum and posterior cortex; and neurotrophins (BDNF and NGF) in the posterior cortex. The results showed that VPA exposure during pregnancy led to neurodevelopmental delays (increased time to locate the nest and to perform the negative geotaxis task), social deficits, and reduced exploratory behavior. Additionally, VPA decreased serum 25(OH)D levels in dams, induced oxidative damage, and altered antioxidant enzyme activity in the posterior cortex and cerebellum. Vitamin D supplementation, either alone or combined with ω -3, was able to attenuate these effects by increasing maternal serum 25(OH)D levels, improving neurodevelopment, sociability, and exploratory activity, reducing oxidative damage, and regulating antioxidant enzymes. In conclusion, vitamin D supplementation significantly attenuated the deleterious effects of VPA, although it did not completely reverse the autistic phenotype. The combination of vitamin D during gestation and ω -3 in the postnatal period did not enhance the preventive effects against ASD-related damage in this experimental model.

Key-words: Neurodevelopment; supplementation; oxidative stress; behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental.....	33
Figura 2 - Peso da prole do dia 9 ^o ao 34 ^o dia pós gestação.....	39
Figura 3 - Níveis séricos de vitamina D nas matrizes	40
Figura 4 – Níveis séricos de vitamina D na prole.....	41
Figura 5 - Teste de busca pelo ninho.....	42
Figura 6 - Teste de Geotaxia Negativa.....	43
Figura 7 - Teste de Campo Aberto.....	44
Figura 8 – Latência para o primeiro encontro e número de encontros com o rato 1 no teste das três câmaras.....	45
Figura 9 – Tempo de interação com o rato 1 no teste das três câmaras.....	46
Figura 10 – Latência para o primeiro encontro e número de encontros com o rato 1 no teste das três câmaras.....	48
Figura 11 – Tempo de interação com o rato 2 no teste das três câmaras.....	49
Figura 12 – Tempo na câmara esquerda no teste das três câmaras.....	50
Figura 13 – Tempo na câmara direita no teste das três câmaras.....	51
Figura 14 – Parâmetros de estresse oxidativo no córtex posterior.....	53
Figura 15 – Parâmetros de estresse oxidativo no cerebelo.....	55
Figura 16 – Níveis de TNF.....	56
Figura 17 – Níveis de neurotrofinas.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA	Sociedade Americana de Psiquiatria (do inglês, <i>American Psychiatric Association</i>)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
CARS	Escala de Avaliação de Autismo de Propriedades Psicométricas de Gilliam (do inglês, <i>Childhood Autism Rating Scale</i>)
CAT	Catalase
CDC	Controle central de doenças (do inglês, <i>Central of Disease Control</i>)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DCFH-DA	2,7-diclorofluoresceína
DG	Dia da gestação
DHA	Ácido docosahexaenóico (do inglês, <i>docosahexaenoic acid</i>)
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DPN	Dia pós-natal
DNPH	Dinitrofenilidrazina
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico (do inglês, <i>eicosapentaenoic acid</i>)
FOX-P2	Proteína ligada ao aprendizado e linguagem
GSH	Glutathiona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICD	Classificação estatística de doenças e problemas relacionados a saúde (do inglês, <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>)
i.p	Via intraperitoneal
ON	Oxído nítrico
NGF	Fator de crescimento nervoso (do inglês: <i>Nerve Growth Factor</i>)
PPA	Ácido propiônico

SOD	Superóxido Dismutase
SH	Sulfidrilas
SAMe	S-Adenosil-L-metionina
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TEA	Transtorno do espectro autista
TNB	derivado amarelo do ácido ditionitrobenzóico
tt	Tióis totais
UNESC	Universidade do Extremo Sul Catarinense
VPS	Síndrome de valproato fetal
VPA	Ácido valproico
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	18
1.1.2 Epidemiologia	19
1.1.3 Abordagem clínica e diagnóstico do tea	21
1.2 ESTADO NUTRICIONAL E NEURODESENVOLVIMENTO	22
1.3 ASSOCIAÇÃO DA VITAMINA D COM TEA	25
1.4 MODELO ANIMAL E INDUÇÃO DE TEA POR MEIO DE VPA	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	30
3.2 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE AUTISMO COM VPA	30
3.2.1 Animais	30
3.2.2 Fase Experimental 1 – Período gestacional	30
3.2.3 Fase experimental 2 – Período pós-natal	31
3.3 PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO	33
3.3.1 Avaliação do ganho de peso da prole	33
3.3.2 Teste de Busca pelo ninho	34
3.3.3 Teste Geotaxia Negativa	34
3.3.4 Avaliação da interação social: teste das três câmaras	34
3.3.5 Teste de Campo Aberto	35
3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	36
3.4.2 Diacetato de diclorofluoresceína (DCFH)	36
3.4.3 Medida de Sulfidrilas Totais	36

3.4.4 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)	37
3.4.5 Atividade da Catalase (CAT)	37
3.4.6 Ensaio imunoenzimático	37
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
4. RESULTADOS	39
4.1 DESENVOLVIMENTO E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D	39
4.1.1 Ganho de peso das ninhadas	39
4.1.1 Níveis de vitamina D nas matrizes e na prole	40
4.1.2 Teste de busca pelo ninho	41
4.1.3 Teste de geotaxia negativa	42
4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS	43
4.2.1 Teste de campo aberto	43
4.2.2 Teste das três câmaras	44
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO A – CERTIFICADO APROVAÇÃO CEUA/UNESC	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Epistemologicamente a palavra “autismo” vem do grego “autos” que significa “de si mesmo” ou “próprio”. Este termo foi usado por Plouller em 1906, mas sua primeira definição clínica ocorreu no ano de 1943, quando o médico austríaco Leo Kanner, sistematizou com cautela a observação de um grupo de crianças com idade de 2 a 8 anos. Na ocasião, o médico denominou o transtorno de distúrbio autístico de contato afetivo (Alves, 2022).

Atualmente, o transtorno do espectro autista (TEA) é caracterizado por comprometimento da interação social e comunicação verbal e não verbal. É um transtorno do neurodesenvolvimento que apresenta padrões de comportamento restritos, repetitivos e estereotipados (APA, 2013), que se acredita ser causado por uma combinação de fatores genéticos e ambientais como exposição a toxinas, infecções, medicamentos como ácido valproico (VPA) e estresse crônico vivenciado durante a gravidez (Frasch et al., 2023), gerando condições duradouras e muitas vezes devastadoras que afetam severamente o funcionamento social e a autossuficiência dos indivíduos (Posar; Visconti, 2017).

Esta condição, segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais-Texto Revisado (DSM-5-TR) da *American Psychiatric Association* (APA), se refere a crianças e adultos com extrema dificuldade de lidar com a mudança, relações sociais e de praticar interações simples. Além disso, as pessoas com TEA podem ter dificuldades na comunicação não verbal que costumam ser usados para promover interação social, bem como dificuldade para construir relacionamentos (APA, 2023), por isso, podem ser considerados como distantes e desapegados (James et al., 2011). Alguns indivíduos com TEA podem se envolver em comportamentos aberrantes que incluem estereotipias motoras (por exemplo, bater palmas, balançar, girar o corpo), comportamentos autolesivos (por exemplo, bater a cabeça) (APA, 2000), e evoluírem com comorbidades frequentes incluindo epilepsia, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), deficiência de aprendizagem, problemas de sono, nutricionais e gastrointestinais, transtornos alimentares, seletividade e alergias alimentares (Jaureguiberry; Venturino, 2022).

No diagnóstico do TEA, as características clínicas individuais são registradas por meio do uso de especificadores (com ou sem comprometimento intelectual

concomitante; com ou sem comprometimento da linguagem concomitante; associado a alguma condição médica ou genética conhecida ou a fator ambiental), bem como questionários que descrevem os sintomas autistas (idade da primeira preocupação; com ou sem perda de habilidades estabelecidas; gravidade) (APA, 2023), podendo ser considerado como uma condição heterogênea do neurodesenvolvimento com uma combinação específica de deficiências na comunicação e interação social, anomalias sensoriais, comportamentos repetitivos e níveis variados de deficiência intelectual que começam cedo na vida (Lord et al., 2020). O paradigma da neurodiversidade considera o TEA como uma forma de variação dentro de uma diversidade de mentes (Pellicano; Den Houting, 2022) e reconhece que alguns indivíduos com TEA também estão relacionados a forças cognitivas, notadamente com excelente atenção e memória aos detalhes e um forte impulso para detectar padrões (Jones et al., 2021).

Diversas características clínicas são comumente comórbidas com o TEA, incluindo ansiedade, hiperatividade, problemas gastrointestinais, distúrbios do sono e atrasos no desenvolvimento motor (Ali et al., 2019), podendo se manifestar de formas diversas com variação de intensidade em cada caso. Além disso, o nível de comprometimento de cada criança é bastante distinto, o que justifica a utilização do termo mais amplo “espectro” (Schmidt, 2017). As características do TEA geralmente continuam na idade adulta na maioria dos casos, o que pode levar à integração social limitada, perspectivas ruins no mercado de trabalho, problemas de saúde mental e uma baixa taxa de participação dos pais ou cuidadores na força de trabalho (Howlin; Magiati, 2017).

Além disso, alterações de um único gene ou cromossomo são responsáveis por apenas uma minoria dos casos de TEA; estudos entre gêmeos idênticos mostraram que, embora a hereditariedade genética tenha uma influência importante, fatores ambientais (por exemplo, ativação imunológica materna, pesticidas ou exposição a metais pesados) podem influenciar fortemente o início e a persistência de traços autistas (Schaefer; Mendelsohn, 2018 citado por Jaureguiberry; Venturino, 2022).

1.1.2 Epidemiologia

No ano de 2010, a prevalência de TEA parecia ter permanecido relativamente estável entre 1990 e 2010 (Baxter et al., 2015). Em maio de 2013, o DSM-5

estabeleceu novas diretrizes para a identificação do TEA, que alguns autores propuseram como uma causa plausível para o aumento da prevalência, uma vez que os transtornos que eram considerados diferentes do autismo no DSM-4 (como o transtorno global do desenvolvimento ou a síndrome de Asperger), passaram a ser enquadrados como TEA no DSM-5. No entanto, uma atenuação da taxa foi observada após a introdução do DSM-5, entre 2013 e 2015 (Jaureguiberry; Venturino, 2022).

Após essa data, diversos estudos foram conduzidos, afirmando um aumento crescente da incidência de TEA no mundo (Lord et al., 2020). Um estudo de coorte de base populacional na Dinamarca mostrou que as alterações nos critérios de diagnóstico e a melhoria dos relatórios foram responsáveis por aumento em 60% da prevalência do TEA, o que levou a uma pesquisa intensiva para identificar os fatores de risco e prevenir a exposição (Hansen et al., 2015 apud Jaureguiberry; Venturino, 2022). O resultado destes esforços é altamente relevante não só para os indivíduos com o TEA e suas famílias que enfrentam encargos financeiros e emocionais substanciais, mas também para os sistemas de saúde pública e educação (Jaureguiberry; Venturino, 2022).

Atualmente, segundo os dados dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, estima que 1 em cada 31 crianças de até 8 anos de idade pode receber o diagnóstico de TEA (Shaw et al., 2025). O TEA ocorre em todos os grupos raciais, étnicos e socioeconômicos, e os homens têm de três a quatro vezes mais probabilidade do que as mulheres de serem diagnosticados com o TEA (Shaw et al., 2025). Estudos epidemiológicos realizados nas últimas décadas mostraram um aumento marcante na prevalência do TEA, que atingiu de 1% a 2% das crianças (Posar; Visconti, 2017), ou seja, uma prevalência geral de 14.65 por 1.000 crianças de 8 anos, com maior expressão em crianças brancas não hispânicas em comparação com as negras não hispânicas e hispânicas (Christensen et al., 2019).

No Brasil, a análise dos dados censitários mais recentes, foi publicada em maio de 2025, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Os dados apontam para a relevância da questão do autismo no cenário nacional, revelando que aproximadamente 2,4 milhões de pessoas (1,2% da população) receberam diagnóstico formal de autismo por um profissional de saúde. A prevalência foi significativamente maior entre homens (1,5%) do que entre mulheres (0,9%), totalizando 1,4 milhões de homens e quase 1 milhão de mulheres diagnosticadas (IBGE, 2025).

A distribuição etária destacou maior concentração em crianças e adolescentes, com picos de 2,6% na faixa de 5 a 9 anos (3,8% em meninos) e 2,1% entre 0 e 4 anos, refletindo a tendência global de diagnóstico precoce. Regionalmente, as prevalências foram homogêneas (1,1% a 1,2%), porém com destaque para o Acre (1,6%), Amapá (1,5%) e Ceará (1,4%). Quanto à cor/raça, pessoas brancas apresentaram maior prevalência (1,3%), enquanto indígenas tiveram a menor (0,9%). Esses dados, inéditos em escala nacional, evidenciam disparidades de gênero e idade, além de possíveis lacunas no acesso a diagnósticos entre grupos raciais, reforçando a necessidade de políticas públicas direcionadas à inclusão educacional e saúde mental, especialmente na infância e adolescência (IBGE, 2025).

1.1.3 Abordagem clínica e diagnóstico do TEA

O diagnóstico de TEA é clínico, com bases em critérios estabelecidos pelo DSM-5-RT (APA, 2023) e pela *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD-11), da *World Health Organization* (WHO) (WHO, 2022). O fato do TEA apresentar características heterogêneas e seu diagnóstico se basear em avaliações clínicas, torna esse processo ainda mais desafiador (Côrtes; Albuquerque, 2020). O diagnóstico clínico é realizado por indicadores, por meio de observações comportamentais e relatos quanto ao histórico do desenvolvimento, guiado por critérios universais e descritivos com base em teorias do desenvolvimento e das neurociências. O ICD-11 manteve a terminologia do TEA e as alterações realizadas no DSM-5 (Fernandes; Tomazelli; Girianelli, 2020).

Os critérios diagnósticos para o TEA, de acordo com as diretrizes do DSM-5 (APA, 2013) são:

- (A) Déficits persistentes na comunicação social e interação social por meio de múltiplos contextos: i) Déficits na reciprocidade socioemocional; ii) Déficits nos comportamentos comunicativos não verbais usados para interação social; iii) Déficits para desenvolver, manter e compreender relacionamentos; iv) Especificar a gravidade atual que baseia-se em prejuízos na comunicação social e em padrões de comportamento restritos e repetitivos.
- (B) Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades: i) Movimentos motores, uso de objetos ou fala estereotipados ou repetitivos; ii) Insistência nas mesmas coisas, adesão inflexível a rotinas ou

padrões ritualizados de comportamento verbal ou não verbal; iii) Interesses fixos e altamente restritos que são anormais em intensidade ou foco; iv) Especificar a gravidade atual que baseia-se em prejuízos na comunicação social e em padrões restritos ou repetitivos de comportamento.

(C) Os sintomas devem estar presentes precocemente no período do desenvolvimento (mas podem não se tornar plenamente manifestos até que as demandas sociais excedam as capacidades limitadas ou podem ser mascarados por estratégias aprendidas mais tarde na vida).

(D) Os sintomas causam prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo no presente.

(E) Essas perturbações não são mais bem explicadas por deficiência intelectual (transtorno do desenvolvimento intelectual) ou por atraso global do desenvolvimento.

A deficiência intelectual e o TEA costumam ser comórbidos e para fazer os seus diagnósticos, a comunicação social deve estar abaixo do esperado para o nível geral do desenvolvimento. O início dos sintomas do TEA ocorre durante o período de desenvolvimento, tipicamente na primeira infância, mas os sintomas característicos podem não se manifestar plenamente até mais tarde, quando as demandas sociais excedem as capacidades limitadas. Os sintomas resultam em prejuízo significativo no funcionamento pessoal, familiar, social, educacional, ocupacional ou em outras áreas importantes do funcionamento. Alguns indivíduos com TEA são capazes de interagir adequadamente em muitos contextos por meio de esforço excepcional, de modo que seus déficits podem não ser aparentes para os outros (WHO, 2022).

1.2 ESTADO NUTRICIONAL E NEURODESENVOLVIMENTO

A exposição pré e/ou perinatal a diferentes estressores ambientais ou déficits nutricionais refletem impactos no resultado do neurodesenvolvimento de acordo com a suscetibilidade genética-variante. Vários aspectos metabólicos têm sido associados à fisiopatologia do TEA e a outros distúrbios. Anormalidades em outras enzimas antioxidantes bem como bioenergética prejudicada associada à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo também foram descritos na fisiopatologia do TEA (Jaureguiberry; Venturino, 2022).

Os hábitos alimentares mudaram notavelmente nas últimas décadas, com uma diminuição significativa na qualidade da fonte e no aumento do consumo de alimentos processados. Sugere-se que a dieta ocidental compromete o suprimento de micronutrientes essenciais, como vitaminas, minerais e ácidos graxos essenciais necessários para o metabolismo e a saúde (Jaureguiberry; Venturino, 2022).

Os ácidos graxos têm sido associados a um papel de destaque durante o desenvolvimento do sistema nervoso central. No tecido cerebral, os ácidos graxos poliinsaturados mais abundantes são os da família ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6). O número de estudos sobre os efeitos desempenhados por ambos os grupos de ácidos graxos sob as funções neuronais continua aumentando (Barón-Mendoza; González-Arenas, 2022).

Os ácidos graxos ω -3 são lipídios essenciais poliinsaturados que o corpo humano não produz e são necessários para o desenvolvimento e funcionamento normal do cérebro e do sistema imunológico. Os peixes e os frutos do mar são as principais fontes (James *et al.*, 2011), entretanto são uma escolha alimentar rara entre indivíduos com TEA (Jaureguiberry; Venturino, 2022). Embora o mecanismo exato pelo qual o ω -3 pode ser benéfico no TEA ainda não esteja totalmente esclarecido, seus déficits estão associados a distúrbios do neurodesenvolvimento como transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, dislexia e dispraxia (James *et al.*, 2011).

Os ácidos graxos ω -3 e ω -6 estão relacionados à regulação de processos cerebrais como na neurogênese, no crescimento de neuritos e na sinaptogênese. Além disso, é observada uma melhora cognitiva com intervenção de ácidos graxos sugerindo um papel regulador destes em relação à plasticidade cerebral (Barón-Mendoza; González-Arenas, 2022).

Em uma pesquisa com modelo animal autista por indução VPA e utilização de ω -3 e 6 foi identificado uma melhora da sintomatologia autista e efeito neuroprotetor, provavelmente devido ao seu efeito anti-oxidativo e anti-inflamatório. O tratamento normalizou o peso dos ratos na vida adulta, aumentou locomoção, diminuiu tempo recuperação da nocicepção termal (Yadav *et al.*, 2017).

Um estudo sobre a utilização do ω -3 no comportamento estereotipado e interações sociais em ratos Wistar com indução de autismo por VPA, evidenciou-se que o tratamento com ω -3 reverteu movimentos estereotipados, o comportamento social de cheirar outros ratos e seguir no teste de interação social recíproca (Fortunato

et al., 2017). Em outro estudo, foi identificado que o ω -3 reverteu danos no aprendizado e memória, resgatou perda neuronal e aumentou o número de neurônios maduros no hipocampo, além de diminuir a peroxidação aumentada no hipocampo e inibir caspase 3 no hipocampo. Ainda foi sugerido que o ω -3 influenciou a via do fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) para mediar expressão de p-CREB e p-CaMKII (Gao et al., 2016).

Sobre a resposta comportamental, uma pesquisa identificou melhora nas dificuldades de comunicação social de crianças e adolescentes, quando estes foram tratados com ω -3 de forma individual (Siafis et al., 2022). De acordo com uma revisão da literatura, a melhora comportamental e cognitiva em indivíduos com TEA após intervenção nutricional com ω -3 e ω -6 pode ser atribuída à capacidade desses compostos em estimular o crescimento de neuritos. Tal processo é provavelmente sustentado por mecanismos celulares como a regulação do citoesqueleto neuronal e a expansão de membranas, viabilizada pela modulação da maquinaria de fusão vesicular (Barón-Mendoza; González-Arenas, 2022).

Os benefícios destes ácidos graxos em indivíduos com TEA podem estar associados a um aumento da eficácia da transmissão sináptica e à modulação da liberação de neurotransmissores (Barón-Mendoza; González-Arenas, 2022). Pesquisas ainda elucidam o efeito da deficiência destes ácidos graxos no desenvolvimento do cérebro, bem como o impacto que um desequilíbrio pode causar na função neuronal e a estreita relação entre o metabolismo alterado de ácidos graxos e as deficiências cerebrais que envolvem a etiologia do TEA. Sendo assim, destaca-se que a recuperação promovida pela intervenção nutricional pode ser considerada não apenas como um plano terapêutico para pessoas com TEA, mas também uma forma de abordar o uso de ω -3 e 6 durante o desenvolvimento fetal (Barón-Mendoza; González-Arenas, 2022).

Em um estudo sobre a utilização do ω -3 em indivíduos com TEA, evidenciou-se uma melhora limitada dos sintomas, especialmente no comportamento estereotipado e no comportamento social, que inclui consciência social, motivação social e função de comunicação, bem como desenvolvimento da linguagem, hiperatividade, comportamento repetitivo, habilidades motoras e concentração (Veselinović et al., 2021). Os efeitos adjuvantes das intervenções com ácidos graxos essenciais são refletidos no alívio dos sintomas comportamentais, como melhora da sociabilidade, comportamentos estereotipados e capacidade motora, que podem ser

estudados como adjuvantes da terapia comportamental no TEA (APA, 2013).

Um ensaio clínico randomizado, realizado no Irã, teve como objetivo avaliar o efeito do ω -3 nas atividades sociais, verbais e comportamentais em crianças com TEA (Doaei et al., 2021). Após a suplementação com 1g de ω -3 por dia durante 8 semanas, os resultados mostraram melhoras significativas em movimentos estereotipados e comunicação social, e pontuação na Escala de Avaliação de Autismo de Propriedades Psicométricas de Gilliam (GARS) para o grupo intervenção em relação ao grupo controle.

1.3 ASSOCIAÇÃO DA VITAMINA D COM TEA

A vitamina D é um hormônio secoesteroide com funções biológicas essenciais, sendo obtida principalmente pela exposição da pele à radiação ultravioleta B e por fontes alimentares, tanto de origem animal (Benedik, 2021) quanto vegetal, como plantas, fungos e leveduras (Pludowski et al., 2018). Seus efeitos mais conhecidos envolvem a homeostase mineral, regulando os níveis de cálcio e fósforo no organismo, e prevenindo doenças como raquitismo e osteomalácia (Bouillon et al., 2019). No entanto, nos últimos anos, diversos estudos têm investigado o potencial terapêutico da vitamina D em várias condições, incluindo doenças cardiovasculares (Manson et al., 2019), depressão (Kaviani et al., 2020), Alzheimer (Jia et al., 2019), TEA (Chien et al., 2024), entre outros.

A deficiência ou insuficiência de vitamina D é considerada um problema de saúde pública global, afetando principalmente gestantes, pessoas com pele mais escura, obesos, crianças e indivíduos com baixa exposição solar (Hosseini-Nezhad & Holick, 2013). A deficiência pode resultar da ingestão insuficiente, pouca exposição solar ou mutações genéticas em enzimas cruciais para o metabolismo da vitamina D, como a vitamina D-25-hidroxilase (CYP2R1) e a 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilase (CYP27B1), que convertem a vitamina D em sua forma biologicamente ativa, o calcitriol (1,25(OH)₂D) (Jenkinson et al., 2022; Blau & Collins, 2015; Bouillon et al., 2022). Mutações no receptor de vitamina D (VDR), essencial para a mediação de seus efeitos, também comprometem sua eficácia (Bouillon et al., 2022).

A vitamina D é fisiologicamente convertida em sua forma ativa encontrada no corpo humano, a 1,25(OH)₂D (Calcitriol ou 1,25-dihidroxicolecalciferol), por meio de

dois processos consecutivos de hidroxilação no fígado e nos rins. O calcitriol é um hormônio neuroativo responsável direto por diferentes aspectos do desenvolvimento cerebral e do desenvolvimento cognitivo inicial. A vitamina D auxilia na proliferação de células neurais e funções de neurotransmissão, afetando os processos de neurodesenvolvimento (Siracusano et al., 2020).

Em um estudo de revisão foi identificada associação entre TEA e o déficit de vitamina D em crianças. O aumento dos níveis séricos de 1,25(OH)D no sangue após a suplementação de vitamina D apresentou melhoria dos sinais e sintomas do TEA em relação às crianças controles (Silva et al., 2021). Guerini et al (2020) sugere que a suplementação de vitamina D pode ser útil em protocolos preventivos e de reabilitação para TEA.

A associação entre a vitamina D e o TEA surgiu a partir da observação do aumento da evidência de maior prevalência de TEA entre crianças que viviam em áreas com baixa incidência de raios ultravioleta-B em comparação com aquelas que residiam em áreas ensolaradas (Cannell, 2017). Uma pesquisa evidenciou que a vitamina D está envolvida na regulação de 223 genes de risco para o TEA, e sua deficiência poderia facilitar a expressão desses genes (Trifonova et al., 2019). Ainda hoje há controvérsias sobre os níveis de vitamina D no TEA. No estudo de caso-controle retrospectivo realizado por Windhan et al (2020), foi observado que níveis mais altos de vitamina D nas mães reduzem o risco de TEA nos meninos, mas aumentam nas meninas. O risco de TEA também diminuiu em filhos de mães brancas não hispânicas com níveis mais altos de vitamina D, mas não foi observado relações em outras raças/grupos étnicos.

Em relação à associação da vitamina D na gravidez e o nascimento de um bebê com TEA, observa-se que concentrações mais baixas de 25-hidroxivitamina D em gestantes podem estar correlacionadas com risco aumentado de fenótipos de TEA. Um estudo utilizando 68 casos, evidenciou que a deficiência de vitamina D durante a gestação, foi associada a um risco 2,4 vezes maior de desenvolvimento de TEA em crianças (Vinkhuyzen et al., 2017).

Já as pesquisas experimentais em modelos animais, identifica-se que a deficiência de vitamina D na prenhez e lactação de ratos altera o cuidado materno e influencia o neurodesenvolvimento e comportamentos afetivos, cognitivos e sociais na prole adulta (Yates et al., 2018). Comparado ao controle, os grupos com deficiência de vitamina D tiveram vocalizações ultrassônicas atípicas, menor

comportamento social, diminuição no gene FOX-P2 (proteína ligada ao aprendizado e linguagem) e expressão neural alterada de genes envolvidos nas vias relacionadas à dopamina e ao glicocorticóide (Yates et al., 2018). No estudo de Du et al (2017), utilizando um modelo animal de TEA, o grupo de ratos não tratado com vitamina D apresentou mais comportamentos repetitivos, estereotipados e ansiosos, e menor comportamento social.

Outro estudo de modelo animal com indução de déficit de vitamina D pela alimentação em ratas prenhas, identificou-se que comparado aos controles, ambos grupos de machos deficientes em vitamina D, mostraram vocalizações ultrassônicas alteradas e comportamento repetitivo e estereotipado. Além disso, os ratos deficientes em vitamina D mostraram desenvolvimento motor atrasado e controle motor afetado (Ali et al., 2019). Os animais adolescentes com deficiência de vitamina D tiveram prejuízo nas interações sociais recíprocas e com hiperatividade na vida adulta (Ali et al., 2019).

Evidências epidemiológicas sugerem que a deficiência de vitamina D pré-natal está associada a um aumento na incidência de TEA (Langguth et al., 2018) e alterações em biomarcadores cerebrais (Alfawaz et al., 2014). Ademais, existe a possibilidade de que a suplementação dietética precoce com vitamina D possa abrir novos caminhos para atenuar ou mesmo prevenir distúrbios do neurodesenvolvimento após inflamação materna durante a gravidez (Vuillermot et al., 2017). No entanto, a sua suplementação deve ser realizada apenas em casos que se constate a necessidade real e ser feita de forma controlada e orientada por conta do risco de intoxicação (Câmara et al., 2021).

1.4 MODELO ANIMAL E INDUÇÃO DE TEA POR MEIO DE VPA

O VPA é um potente teratogênio. Há uma clara relação da exposição ao VPA durante o primeiro trimestre da gravidez a defeitos do tubo neural e outras malformações congênitas, como defeito do septo atrial, fenda palatina, hipospádia, polidactilia e craniossinostose. Além disso, a exposição ainda no útero ao VPA está associada ao aumento do risco de função cognitiva prejudicada (Nicolini; Fahnestock, 2018).

O VPA também é um fator de risco para o TEA, pois sua exposição durante

o primeiro trimestre da gravidez foi originalmente associada ao TEA com base em estudos que mostraram uma alta incidência de sintomas autistas em crianças com síndrome de valproato fetal, uma embriofetopatia induzida por VPA (Nicolini; Fahnestock, 2018). Os roedores expostos pré-natalmente ao VPA apresentam déficits comportamentais semelhantes aos observados em indivíduos com TEA. Assim, a exposição materna ao VPA em roedores tem sido usada extensivamente como um modelo da condição humana, para aumentar a compreensão da neurobiologia subjacente ao comportamento autista e para rastrear novos medicamentos para a terapia do autismo (Nicolini; Fahnestock, 2018).

Considerando os avanços recentes sobre o papel da vitamina D durante a gestação e os efeitos benéficos do ω -3 no período pós-natal (PN), especialmente na melhora de características inerentes ao TEA, o presente estudo buscou contribuir para o avanço do conhecimento científico acerca do uso destes compostos na prevenção e/ou tratamento do TEA. Neste sentido, o projeto avaliou os efeitos do uso combinado de vitamina D durante a gestação e do ω -3 na primeira infância em prole de ratos *Wistar*, sob parâmetros comportamentais e bioquímicas no cérebro de ratos induzidos quimicamente ao modelo de TEA.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D na gestação associado ao uso do ω -3 na prole de ratos *Wistar* em um modelo experimental de TEA induzido por VPA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o peso da prole no 9^o, 14^o, 19^o, 24^o, 29^o e 34^o dia pós-natal (DPN), bem como analisar a busca pelo ninho no 10^o DPN e geotaxia negativa no 14^o DPN, como indicadores de desenvolvimento e crescimento em ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA induzido por VPA e expostos ao tratamento com vitamina D no período gestacional e ω -3 no PN;
- Investigar a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e danos oxidativos dos animais submetidos ao modelo experimental de TEA induzido por VPA e expostos ao tratamento com vitamina D no período gestacional e ω -3 no PN;
- Avaliar os níveis proteicos de citocina TNF dos animais submetidos ao modelo experimental de TEA induzido por VPA e expostos ao tratamento com vitamina D no período gestacional e ω -3 no PN;
- Quantificar os níveis proteicos de fatores neurotróficos (NGF e BDNF) no córtex posterior de animais submetidos ao modelo experimental de TEA induzido por VPA e expostos ao tratamento com vitamina D no período gestacional e ω -3 no PN.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Conforme a lei n. 11.794 de 8 de outubro de 2008, do decreto n. 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), o presente projeto de pesquisa foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) com o número de protocolo 35/2022 e aprovado em 14 de junho de 2022 (Anexo I). Todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante todo o experimento.

3.2 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE AUTISMO COM VPA

3.2.1 Animais

Para o projeto, foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos e fêmeas adultas para gerar a prole de filhotes machos, utilizados no estudo. Os animais foram procedentes do biotério da UNESC e ficaram acondicionados com as mães até o desmame no 21º DPN. Após isso, os animais foram acondicionados em gaiolas (comprimento 41 cm x largura 34 cm x altura 17 cm) com 5 animais cada, sob ciclo de claro e escuro de 12 horas (6h às 18h claro), com livre acesso ao alimento padrão para roedores da Nuvilab (NUVITAL) e água filtrada. O ambiente foi mantido à temperatura constante e diária de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. A maravalha que forra as caixas dos animais foi trocada a cada 2 dias e a sala apresentava o sistema de exaustor, de modo a mantê-los com o máximo de conforto possível.

3.2.2 Fase Experimental 1 – Período gestacional

O protocolo experimental inicia com a indução do efeito Whitten (ativação do ciclo estral) em 39 fêmeas e acasalamento com 13 machos. Inicialmente, foi adicionado nas caixas, contendo 3 fêmeas cada, uma porção de maravalha suja da caixa dos machos, para que o cheiro induzisse o efeito Whitten. Dois dias após a indução, foi adicionado um macho na caixa contendo fêmeas para que acasalassem durante o período noturno. No dia seguinte ao acasalamento, foi realizado um lavado vaginal com 80uL de solução salina 0,9% e pH 7,4 (SAL) com auxílio de pipeta automática e o conteúdo foi visualizado em microscópio, com aumento de 40x. Se

verificado conteúdo seminal na lâmina, a fêmea era considerada grávida, estando no dia gestacional (DG) 0,5. O processo de acasalamento foi repetido até que houvesse 39 fêmeas grávidas.

O tratamento com vitamina D, durante o período gestacional, ocorreu por 21 dias, entre o DG 0,5 e 20. Para isto, foi administrado de forma passiva, diariamente, 500 UI de vitamina D (D Valle – Vitamina D3 10.000 UI/mL (DOVALLE®)) em gelatina de ágar-ágar (Vit.D) (Lorenzon et al., 2023). Desta forma, 21 fêmeas grávidas receberam gelatina suplementada com Vit.D (grupo Vit.D) e 18 fêmeas grávidas receberam gelatina controle (grupo controle).

Ainda durante a gestação, no 12º DG, cada um dos grupos foi subdividido em dois grupos, para a indução química do modelo animal de autismo (Schneider e Przewlocki, 2005), gerando 4 grupos experimentais. Para isto, em um dos grupos Vit.D foi administrado, via intraperitoneal (i.p.) em dose única, 600 mg/Kg de VPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolvido em SAL e o outro grupo Vit.D recebeu SAL. O mesmo ocorreu com os dois grupos controle.

3.2.3 Fase experimental 2 – Período pós-natal

Após o nascimento, no 2º DPN, as fêmeas foram eutanasiadas e apenas os machos permaneceram no experimento, com uma ninhada de 4-6 animais. No 9º DPN, os filhotes foram pesados e entre o 10º e 16º DPN, foi verificado o abrir dos olhos dos mesmo. Além disso, no 10º DPN, a prole foi submetida ao teste de busca pelo ninho e no DPN 14, ao teste de geotaxia negativa, antes de iniciar a intervenção com ω -3.

Após a geotaxia negativa, no 14º DPN, a prole foi subdividida em 8 grupos, conforme a Tabela 1, para iniciar o tratamento com ω -3. Os filhotes de uma mesma matriz eram destinados a diferentes grupos experimentais para minimizar o viés de ninhada. Para isso, foi utilizado um código de cores nas caudas dos animais, onde cada cor representava um grupo.

Tabela 1. Descrição esquemática dos grupos experimentais.

GRUPOS	TRATAMENTO MATRIZES (gestacional)	MODELO (gestacional)	TRATAMENTO PROLE (pós-gestacional)
1	Gelatina CT	SAL	Óleo de coco
2	Gelatina CT	SAL	ω -3
3	Gelatina com Vit. D	SAL	Óleo de coco
4	Gelatina com Vit. D	SAL	ω -3
5	Gelatina CT	VPA	Óleo de coco
6	Gelatina CT	VPA	ω -3
7	Gelatina com Vit. D	VPA	Óleo de coco
8	Gelatina com Vit. D	VPA	ω -3

CT, controle; Vit. D, vitamina D; SAL, solução salina; VPA, ácido valpróico. Fonte: Elaborado pela autora.

O ω -3 (Ômega 3 plus Vitafor[®] com 990 mg de ácido eicosapentaenóico (EPA) e 660 mg de ácido docosahexaenóico (DHA) por dose), após retirado o óleo da cápsula foi administrado na prole durante 21 dias (DPN 14-34) via gavagem. Esta idade representa desde infância até a pré-adolescência dos ratos (Ghasemi et al. 2021). A concentração utilizada foi seguindo o modelo de Gao et al. (2016), 300 mg/kg de DHA. Já a concentração de EPA foi de 450 mg/Kg. Em um rato filhote de 50g, foi necessário ~50 uL de ω -3, via gavagem. Todos os dias os animais eram pesados e a dose administrada era corrigida pelo peso. Sendo assim os animais foram pesados entre os DPN 14 e 34.

Os filhotes foram desmamados no 21^o DPN e randomizados em caixas padrão, com até 5 animais cada. As matrizes foram anestesiadas no mesmo dia para que fosse extraído o sangue via punção cardíaca, para analisar os níveis de vitamina D no sangue das ratas progenitoras.

Após o tratamento finalizar, os parâmetros comportamentais dos animais foram avaliados nos DPN 35 e 36 e a eutanásia ocorreu após o último teste comportamental, no 36^o DPN. Cerca de 1 mL de sangue dos animais foi coletado para analisar os níveis de metabólitos de vitamina D [25(OH)D] e TNF e o encéfalo de todos os animais foi dissecado para isolamento das estruturas, como o córtex frontal, córtex posterior e cerebelo, para quantificação de citocinas e parâmetros de estresse oxidativo.

A Figura 1 apresenta o delineamento temporal detalhado do estudo, ilustrando

as etapas desde a indução do efeito *Whitten* até o processo final com a análise do material biológico.

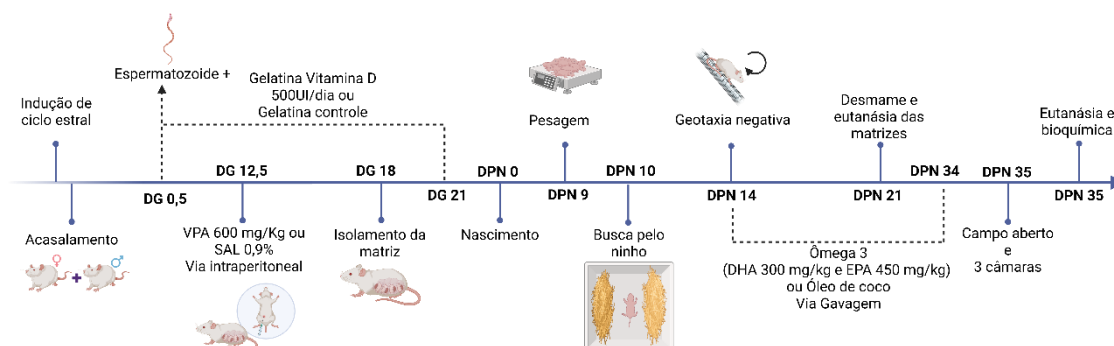


Figura 3 – Desenho experimental. O protocolo experimental inicia com a indução do efeito Whitten e acasalamento dos animais. Quando verificada a prenhez, no dia gestacional (DG) 0,5 as fêmeas foram consideradas como grávidas (matrizes). Entre o DG 0,5 e DG 21, foi administrado Vitamina D (500 UI/dia), incluída em gelatina de agar-agar ou apenas a gelatina (grupo controle). No DG 12,5, foi induzido o modelo animal de autismo, com injeção intraperitoneal de 600 mg/Kg de ácido valpróico (VPA) ou solução salina 0,9%. No DG 18 as matrizes foram isoladas para iniciar o comportamento de ninho e o dia do nascimento foi considerado o DPN 0. No DPN 9 e entre o DPN 14 e 34 os animais foram pesados. No DPN 10 todas as proles foram submetidas ao teste de busca pelo ninho e no DPN 14 ao teste de geotaxia negativa. Entre o DPN 14 e 34, os animais dos respectivos grupos receberam ômega-3 (300 mg/Kg de DHA e 450 mg/Kg de EPA, uma vez ao dia) ou óleo de coco, via gavagem. No DPN 21 foi realizado o desmame e a eutanásia das matrizes e no DPN 35 os filhotes realizaram os testes comportamentais de campo aberto e três câmaras e por fim foram eutanasiados. DG: dia gestacional; VPA: ácido valpróico; SAL: solução salina 0,9%; DPN: dia pós-natal; DHA: ácido docosahexaenóico; EPA: ácido eicosapentaenóico. Fonte: A autora.

3.3 PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTO

3.3.1 Avaliação do ganho de peso da prole

O peso da prole foi avaliado no DPN 9 e entre os DPN 14 ao 34^o. Cada filhote foi pesado individualmente utilizando uma balança de precisão, com os registros utilizados para análise posterior. A avaliação do peso é uma medida importante do desenvolvimento físico e pode indicar a saúde geral da prole, bem como os efeitos de diferentes tratamentos ou manipulações experimentais (Schneider; Przewlocki, 2005).

Para avaliação do peso da prole no DPN 9, foi adotada a seguinte sequência: 1) foi retirada a matriz da caixa com os filhotes e colocada em uma caixa limpa; 2) foi colocado um punhado de maravalha da caixa dos animais dentro da bacia e tarado a balança; 3) esfregou-se a maravalha da caixa com os filhotes nas mãos para evitar transferir algum outro cheiro para os animais; 4) a ninhada foi colocada (todos os filhotes juntos) com cuidado na bacia e anotado quantos animais e o peso da ninhada

no caderno de anotações; 5) posteriormente, os mesmos foram devolvidos na caixa original e a matriz foi então devolvida também para a caixa original com os filhotes. Depois da pesagem, os animais foram devolvidos para o biotério. Após o desmame, os animais foram pesados individualmente todos os dias, antes da administração do ω -3.

3.3.2 Teste de Busca pelo ninho

No 10^o DPN todos os animais foram avaliados. O teste consistia em uma caixa padrão de ratos (30 x 20 x 13 cm) dividido em três partes (duas laterais e uma central). As partes laterais foram cobertas com maravalha e foi deixado um centro claro descoberto sem maravalha. Um lado foi preenchido com a cama da gaiola (maravalha do ninho familiar) e o outro lado com maravalha esterilizada. Os filhotes (individualmente) foram colocados no centro do aparato com a cabeça voltada para o pesquisador e a latência para fazer qualquer escolha e chegar a uma das maravalhas foram registrados. O tempo total do teste se limitou a 60 segundos. Para manter o cheiro da ninhada/matriz, não foi trocada a maravalha da gaiola-casa nos 2 dias anteriores ao teste (Gregory e Pfaff, 1971; Schneider e Przewlocki, 2005). Após o teste comportamental, o aparato foi limpo com álcool 70% seguindo de álcool 10%, e o animal retornou para sua caixa de origem e devolvido ao biotério.

3.3.3 Teste Geotaxia Negativa

No 14^o DPN os animais foram colocados em uma rampa com 45 graus de inclinação, com a cabeça direcionada para baixo. Foi registrado o tempo que cada animal levava para virar para a posição oposta, ou seja, com a cabeça voltada para cima. Os animais que não apresentaram reflexo na primeira tentativa foram testados mais duas vezes. Sendo que cada animal tinha, no máximo, três chances. O tempo que o animal levou para realizar a tarefa foi quantificado em segundos e o tempo máximo para cada tentativa foi de 60 segundos (Ruhela et al., 2019).

3.3.4 Avaliação da interação social: teste das três câmaras

No 35^o DPN, os ratos foram submetidos ao teste de interação social, conforme descrito por Moy e colaboradores (2004). O teste se baseia na tendência natural que os roedores têm de investigar animais considerados desconhecidos, intrusos. Os

animais foram colocados em um aparato composto por três câmaras de acrílico (120x40x40cm) conectadas com divisórias removíveis (10x20cm). Primeiramente, o rato foi colocado na câmara central por um período de habituação de 5 minutos. Após a habituação, um rato desconhecido (rato 1) foi colocado em uma pequena gaiola na câmara esquerda enquanto a câmara direita permaneceu vazia, e as divisórias foram removidas para permitir que o rato de teste explorasse todas as três câmaras livremente por 10 minutos. Após esse tempo, o rato de teste foi colocado na câmara central, cercado pelas divisórias, e um segundo rato desconhecido (rato 2) foi introduzido na câmara direita. Subsequentemente, as divisórias foram removidas para permitir que o animal de teste explorasse o aparelho por mais 10 minutos. Os seguintes parâmetros foram registrados: latência para o primeiro encontro com o rato 1 e o rato 2, o número de encontros com o rato 1 e o rato 2 em cada fase, o tempo de interação com o rato 1 e o rato 2 e o tempo gasto em cada câmara (direita, esquerda e central). Após o teste, o aparelho foi limpo com álcool 70%, seguido por álcool 10%. O animal foi colocado de volta em sua gaiola original.

3.3.5 Teste de Campo Aberto

Este modelo foi descrito originalmente em 1984 por Hall para avaliar a emocionalidade em ratos e hoje é um dos procedimentos mais populares da psicologia animal (Prut; Belzung, 2003), sendo empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo ambiente novo. No 35º DPN, os ratos foram submetidos à avaliação do comportamento da atividade exploratória, locomotora e memória de habituação, realizados por meio do teste de campo aberto. O teste foi realizado em uma arena quadrada (60 x 60 x 48cm) com piso dividido em 9 quadrados iguais. O animal foi colocado em um quadrante do vértice e deixado a explorar por 5 minutos. Dentro deste tempo, foram contabilizados o número de vezes que o animal cruzou os quadrantes com as quatro patas (indicador de atividade locomotora) e o número de vezes que ele se levantou sobre as patas traseiras (indicador de atividade exploratória) (Schneider; Przewlocki, 2005; Wultz *et al.*, 1990). Após o teste comportamental, o aparato foi limpo com álcool 70% seguido de álcool 10%, o animal devolvido para sua caixa de origem e devolvido ao biotério.

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Após a conclusão dos testes comportamentais, os ratos foram eutanasiados por decapitação e o cérebro dissecado em: córtex posterior, córtex frontal e cerebelo, de acordo com o método descrito por Glowinski e Iversen (1966). A partir do homogenato destas regiões encefálicas, os seguintes testes bioquímicos foram conduzidos: avaliação da produção de radicais livres pela oxidação da diclorodifluoresceína (DCFH), concentração de nitrito/nitrato, concentração de sulfidrilas (SH), atividade da enzima catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD). Além disso, foram analisados os níveis de BDNF, NGF e TNF córtex posterior e soro dos animais.

3.4.2 Diacetato de diclorofluoresceína (DCFH)

A produção de espécies reativas em cérebros submetidos à exposição à Vit.D e ao ácido valpróico no pré-natal e ω -3 no pós natal foi determinada de acordo com o método de Lebel, Ischiropoulos e Bondy (1992), utilizando-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA). Às alíquotas de amostras (80 μ g de proteína) previamente homogeneizadas foram adicionadas diacetato do DCFH, a qual é permeável à membrana celular, sendo as alíquotas incubadas durante 30 minutos à 37 °C. No meio intracelular, esterases clivaram o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidaram o DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 μ M) e os resultados foram expressos como pmol de DCF.mg de proteína⁻¹.

3.4.3 Medida de Sulfidrilas Totais

Este método determina quantidade de SH não oxidadas, que estão presentes nos aminoácidos. Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo (TNB), lido a 412 nm em espectrofotômetro. Com isso, o método determina os tióis totais (TT) da amostra.

3.4.4 Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)

Primeiramente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Foram adicionados à amostra catalase 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente a 480nm a temperatura de 37°. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína.

3.4.5 Atividade da Catalase (CAT)

As amostras foram suspensas em tampão PBS e uma alíquota desta suspensão foi diluída em tampão catalase, posteriormente uma alíquota desta diluição foi novamente diluída em tampão catalase. Após centrifugação da solução resultante, o meio reacional foi preparado com a adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e tampão catalase. O branco foi preparado sem a adição de H₂O₂ e a atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do H₂O₂ em 240 nm a temperatura ambiente nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U/mg de proteína.

3.4.6 Ensaio imunoenzimático

As amostras foram processadas e após, a placa foi sensibilizada para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem da citocina (TNF) e também as neurotrofinas BDNF e NGF, foi utilizado o método *enzyme-linked immuno absorbent assay* (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS e os gráficos construídos utilizando o programa GraphPad versão 9.0. A verificação da normalidade dos dados foi conduzida através do teste de Shapiro-Wilk, sendo este critério determinante para a escolha dos testes subsequentes. Para dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicada a ANOVA de três vias, seguida do teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos. Para as análises de dados com distribuição anormal, foi utilizado o teste não paramétrico de

Kruskal-Wallis. O critério de significância utilizado será de $p < 0,05$. Os asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância.

4. RESULTADOS

4.1 DESENVOLVIMENTO E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D

Para avaliar se a exposição pré-natal à Vit.D, combinada à exposição pós-natal ao ω -3, exerce um efeito protetor contra os prejuízos no crescimento e desenvolvimento causados pelo VPA, foram realizados os testes de busca pelo ninho e de geotaxia negativa, indicativos do neurodesenvolvimento, além do monitoramento do ganho de peso. Os níveis de 25(OH)D no soro das matrizes e das proles, também foram dosados.

4.1.1 Ganho de peso das ninhadas

Ao analisar o ganho peso da prole, verificamos que todos os grupos ganharam peso ao longo do período estudado (9º ao 34º DPN), independente do tratamento proposto (figura 2).

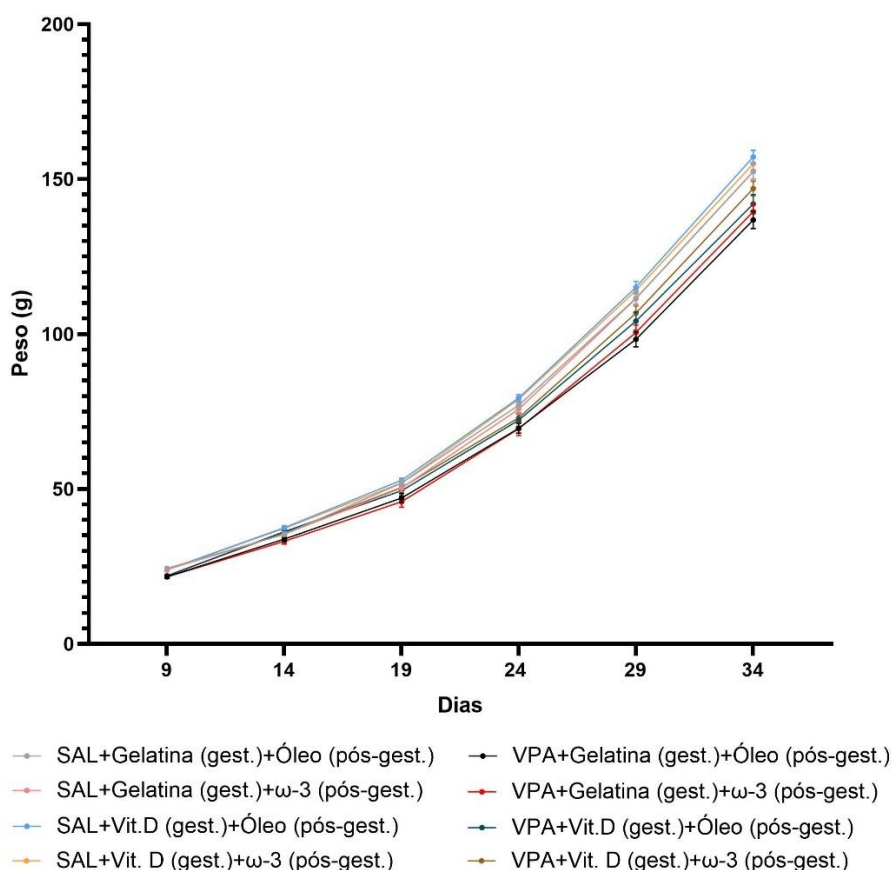


Figura 4 - Peso da prole do dia 9º ao 34º dia pós gestação. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal, no peso (gramas) da prole dos animais testados individualmente. O peso foi avaliado no dia 9 e entre os dias 14 e 34 pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 11-19$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. Fonte: A autora.

4.1.1 Níveis de vitamina D nas matrizes e na prole

Na figura 3, estão apresentadas as dosagens de 25(OH)D, que é o metabólito utilizado para identificar o estado de carência ou excesso de vitamina D no organismo dos quatro grupos das matrizes: 1) matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação; 2) matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit.D e SAL na gestação; 3) matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação; 4) matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação. Foi possível observar que o grupo CT+VPA apresentou níveis menores de 25(OH)D em comparação ao grupo CT+SAL ($p<0,01$). Em contrapartida, quando houve a suplementação com Vit.D no grupo VPA, os níveis da 25(OH)D aumentaram, quando comparado com o grupo VPA sem suplementação ($p<0,05$).

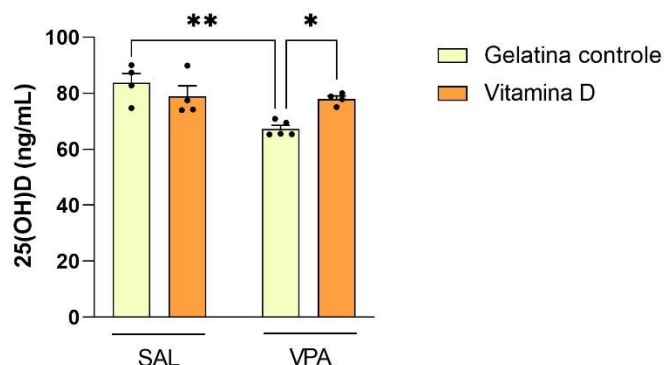


Figura 3 - Níveis séricos de vitamina D nas matrizes. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, nos níveis séricos de vitamina D das matrizes divididas por grupos: matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação; matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit.D e SAL na gestação; matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação; matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 4-5$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de post hoc de Tukey. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Conforme ilustrado na figura 4, não houve diferenças significativas nos níveis séricos de 25(OH)D entre os grupos da prole.

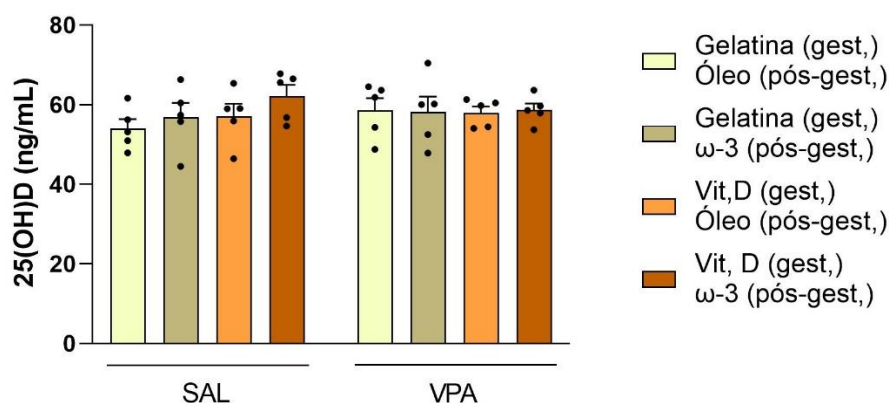


Figura 4 – Níveis séricos de vitamina D na prole. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal, nos níveis séricos de vitamina D das proles. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 4-5$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. Fonte: A autora.

4.1.2 Teste de busca pelo ninho

Ao analisar o tempo para chegar ao ninho, no 10° DPN (figura 5), foi observado que as proles do modelo animal de TEA sem tratamento, ou seja, de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação (CT+VPA), precisou de um tempo maior para chegar ao ninho quando comparado à prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação (CT+SAL, $p < 0,05$). De modo interessante, quando os animais do modelo animal de TEA foram tratados com Vit. D (Vit.D+VPA), houve uma diminuição no tempo necessário para chegar ao ninho, em comparação com o grupo CT+VPA ($p < 0,05$).

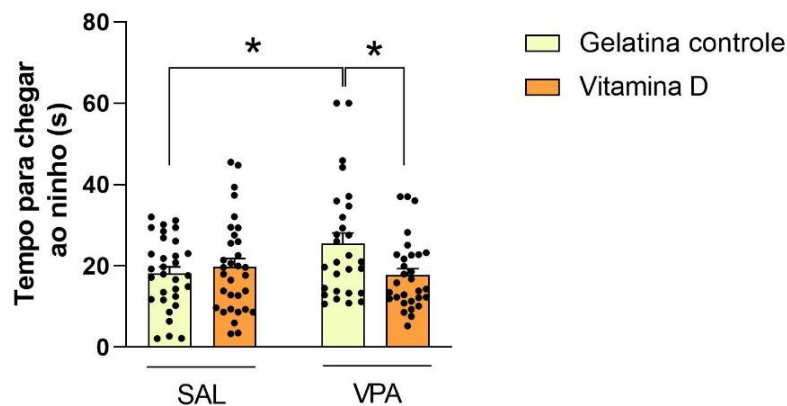


Figura 5 - Teste de busca pelo ninho. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA no tempo (segundos) gasto pela prole para chegar ao ninho materno. O teste foi realizado no 10º DPN na prole de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação; matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit.D e SAL na gestação; matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação; matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média (n = 30-34 animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de post hoc de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

4.1.3 Teste de geotaxia negativa

No teste de geotaxia negativa (figura 6), que observou a latência (s) para girar 180° como resposta à gravidade da prole, no 14º DPN, foi observado que a prole CT+VPA levou mais tempo para se posicionar com a cabeça voltada para cima, em comparação à prole CT+SAL e Vit.D+SAL ($p < 0,05$). Por outro lado, a prole VPA + Vit.D apresentou menor latência para completar o giro ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Vit.D+ SAL.

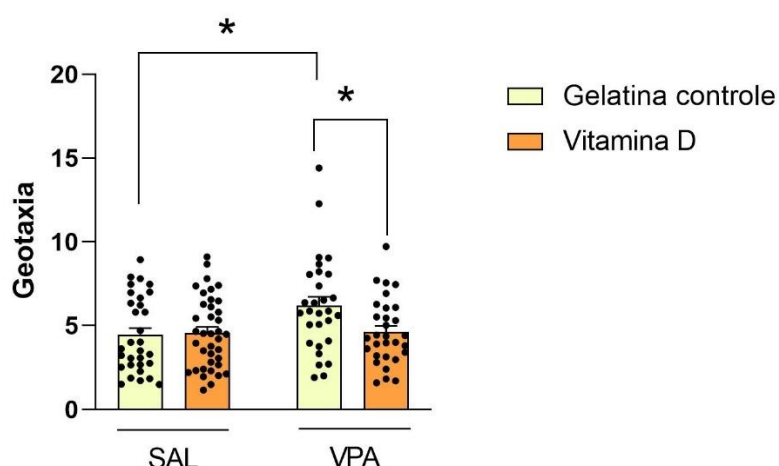


Figura 6 - Teste de Geotaxia Negativa. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA no tempo gasto pela prole para retornar a cabeça para o lado oposto. O teste foi realizado no 10º DPN na prole de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação; matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit.D e SAL na gestação; matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação; matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 30-34$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de post hoc de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e três câmaras no 35º DPN para verificar os efeitos da exposição pré-natal à Vit.D, combinada à exposição pós-natal ao $\omega-3$, sobre parâmetros comportamentais típicos do modelo animal de TEA induzido por VPA.

4.2.1 Teste de campo aberto

No teste de campo aberto foi analisado o número de cruzamentos e o número de levantadas entre as proles (figura 7). Em relação ao número de cruzamentos (figura 7a), não houve diferenças significativas. Já no número de levantadas (figura 7b), os grupos VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) e VPA + Gelatina (gest.) + $\omega-3$ (pós-gest.), levantaram significativamente menos vezes em comparação ao grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) e SAL + Gelatina + $\omega-3$ (pós-gest.) ($p < 0,05$), respectivamente.

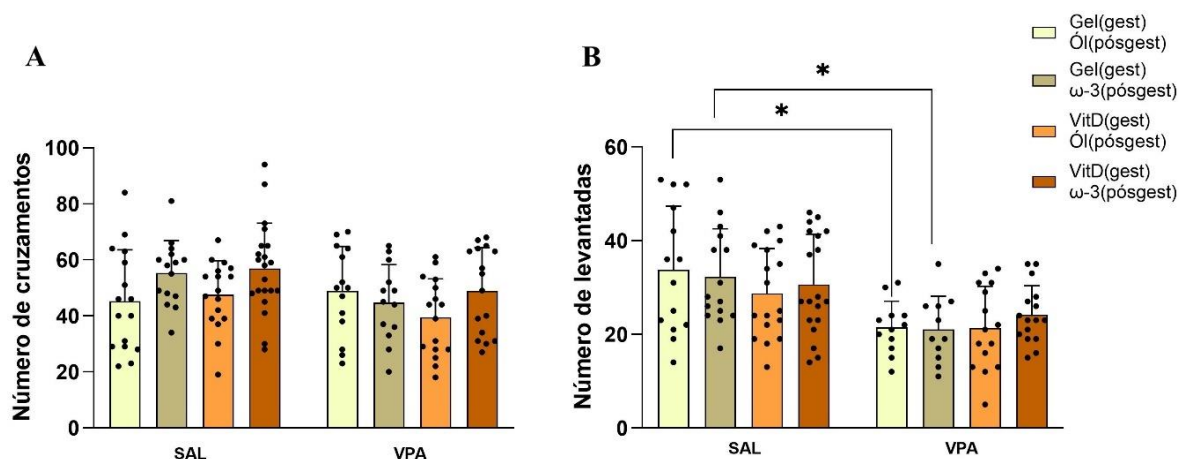


Figura 7 - Teste de Campo Aberto. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal no teste de campo aberto da prole, realizado no 35º DPN. **a)** Número de cruzamentos e **b)** Número de levantadas. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 11-19$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

4.2.2 Teste das três câmaras

O teste das três câmaras é dividido em duas etapas (2 *rounds*), que acontecem após um período de 5 minutos de ambientação na câmara central do aparato. No *round 1*, um animal desconhecido (rato 1) para o rato teste é adicionado à câmara da esquerda (dentro de uma gaiola) e o rato teste fica livre para explorar todas as três câmaras (câmara esquerda com rato 1, câmara central vazia e câmara direita vazia); no *round 2*, um segundo rato desconhecido (rato 2) é adicionado à câmara direita, e novamente o rato teste fica livre para explorar todas as três câmaras (câmara esquerda com rato 1, câmara central vazia e câmara direita com rato 2).

O primeiro parâmetro coletado é o tempo que o animal teste leva para encontrar pela primeira vez o rato 1, sendo chamado de "latência para o primeiro encontro" (figura 8a). Foi possível observar que os animais VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) demoraram mais tempo para ir ao encontro do rato 1, se comparado ao grupo SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,05$). Além disso, o grupo VPA + Vit. D

(gest.) + ω -3 (pós-gest.), levou mais tempo para encontrar o rato 1 quando comparado aos grupos SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,05$) e SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,01$), evidenciando que o tratamento Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) não apresentou efeitos protetores nos animais VPA expostos.

O segundo parâmetro analisado, foi o número total de encontros que o rato teste fez como o rato 1 (figura 8b). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos.

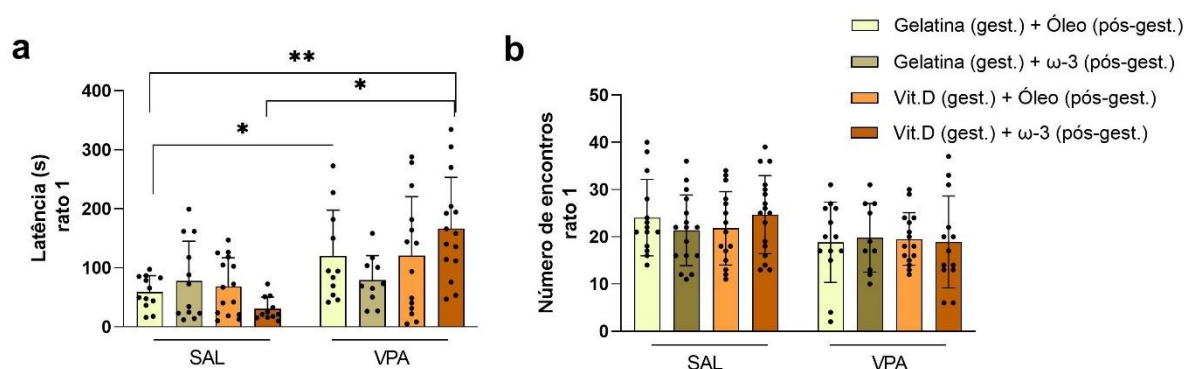


Figura 8 – Latência para o primeiro encontro e número de encontros com o rato 1 no teste das três câmaras. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal nos parâmetros coletados em relação ao rato 1, sem distinção de *rounds* no teste das três câmaras, realizado no 35º DPN. **a)** Latência (segundos) para o primeiro encontro com o Rato 1 e **b)** Número total de encontros com o rato 1. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 11-19$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Durante os primeiros 10 minutos de teste (etapa 1), foi contabilizado e cronometrado alguns parâmetros, como a latência para o primeiro encontro (figura 8a) e número total de encontros com o rato 1 (figura 8b). Além desses, também foram coletados dados como o tempo de interação com o rato 1, que foi coletado durante os primeiros 10 minutos (*round 1*) e os últimos 10 minutos (*round 2*). Isso porque, após os 10 minutos iniciais, foi adicionado um segundo animal desconhecido (rato 2) do rato teste, dando início à etapa 2 do teste. Ou seja, no *round 2* havia o rato 2, que era

desconhecido do rato teste, e o rato 1, que neste momento era conhecido do rato teste, já que permaneceu no aparato desde o *round* 1.

Sendo assim, parâmetros como o tempo de interação com o rato 1, foram coletados durante o *round* 1 e *round* 2, sendo apresentados na figura 9. Conforme observado, os ratos de todos os grupos expostos à SAL durante a gestação (SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.); SAL + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.); SAL + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.); SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.)) interagiram por menos tempo com rato 1 no *round* 2, quando estes grupos são comparados a eles mesmos no *round* 1. Os animais expostos ao VPA durante a gestação, não apresentaram diferenças significativas no tempo de interação com o rato 1 entre o *round* 1 e o *round* 2, evidenciando déficit neste parâmetro de novidade social.

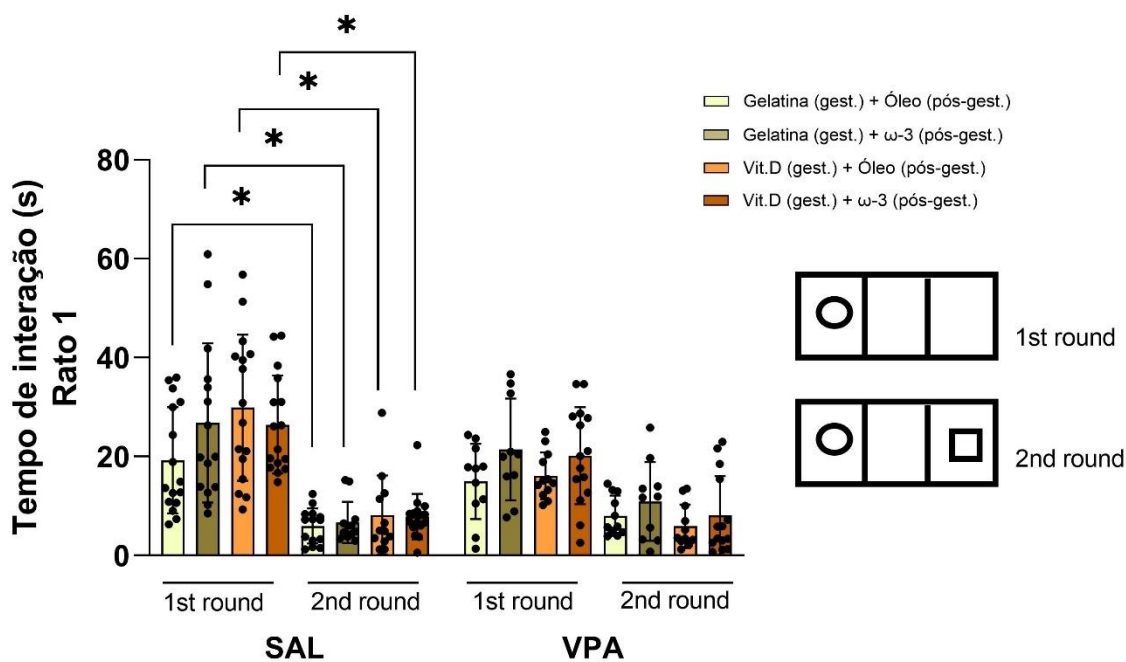


Figura 9 – Tempo de interação com o rato 1 no teste das três câmaras. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal no tempo de interação com o rato 1, com distinção de *rounds*, realizado no 35º DPN. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 11-19$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Assim que foi colocado o rato 2 na câmara direita, o rato teste foi liberado para explorar novamente o ambiente e optar por interagir com o rato 1 e rato 2, foi registrado o tempo que o rato teste levou para interagir pela primeira vez com o rato 2 (o desconhecido) (figura 10A), o número de encontros com o rato 2 (figura 10B) e o tempo de interação com o rato 2 (figura 11). Como o rato 1 estava presente apenas no round 2, não há distinção destes parâmetros entre *round 1* e *round 2*.

Conforme mostra a figura 10a, os animais do grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) levaram mais tempo para interagir a primeira vez com o rato 2, em comparação com o grupo SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,001$). Da mesma forma, o grupo VPA + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.) demorou mais para encontrar o rato 1 a primeira vez, quando comparado com os grupos SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) e SAL + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,05$ para ambas as comparações). Em contrapartida, quando os animais VPA foram expostos à Vit.D na gestação (VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.)) o tempo para encontrar o rato 2 foi significativamente reduzido em comparação ao grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,05$). Por fim, o grupo VPA tratado na gestação com Vit.D e no pós-natal com ω -3 (VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.)), encontrou o rato 2 mais rápido do que o grupo tratado apenas com o ω -3 (VPA + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.)) ($p < 0,05$).

Não houve diferenças significativas entre os grupos no número de encontros com o rato 2, conforme mostra a figura 10b.

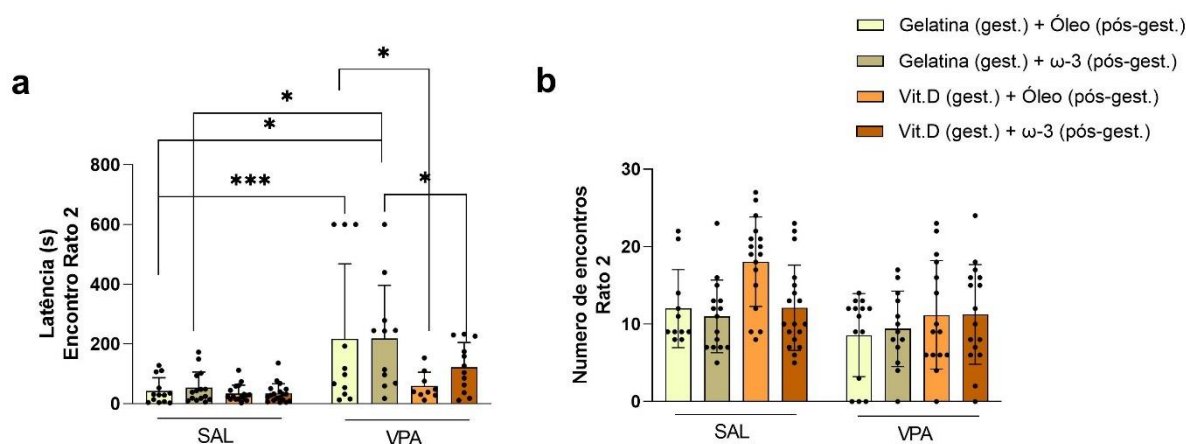


Figura 10 – Latência para o primeiro encontro e número de encontros com o rato 2 no teste das três câmaras. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal nos parâmetros coletados em relação ao rato 2, sem distinção de *rounds* no teste das três câmaras, realizado no 35º DPN. **a)** Latência (segundos) para o primeiro encontro com o Rato 2 e **b)** Número total de encontros com o rato 2. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 13-19$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Em relação ao tempo de interação com o rato 2 (figura 11), houve um aumento significativo no tempo de interação apenas no grupo SAL + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.), em comparação ao grupo SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.).

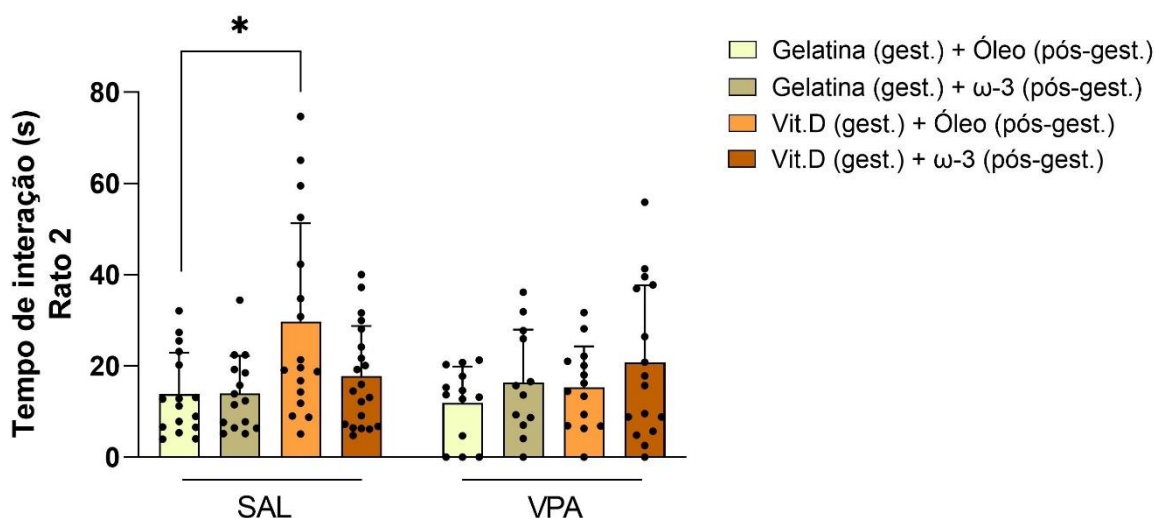


Figura 11 – Tempo de interação com o rato 2 no teste das três câmaras. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-atal no tempo de interação com o rato 2, realizado no 35º DPN. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 11-19$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Por fim, os últimos parâmetros analisados no teste das três câmaras foram o tempo que o rato teste passou na câmara esquerda (onde estava o rato 1) ou na câmara direita (onde estava o rato 2), no *round 1* e *round 2*, mesmo que não estivesse interagindo com o rato 1 ou 2.

Na figura 12 é observado que, no *round 2*, todos os animais exposto à SAL no período gestacional (SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.); SAL + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.); SAL + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.); SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.)), passaram menos tempo na câmara esquerda no *round 2*, onde estava o rato 1, em comparação a eles mesmos no *round 1*. Já os animais expostos ao VPA, não apresentaram diferenças significativas, evidenciando déficit neste parâmetro de novidade social.

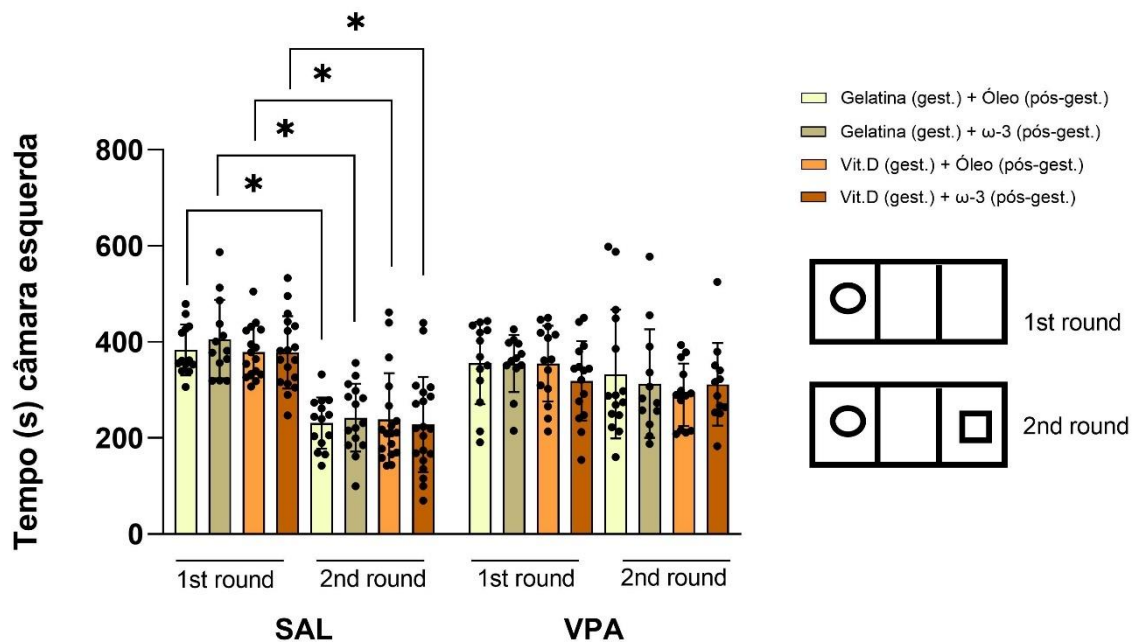


Figura 12 – Tempo na câmara esquerda no teste das três câmaras. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal no tempo passado na câmara esquerda, com distinção de rounds, realizado no 35º DPN. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 11-19$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Corroborando com o dados anterior, quando analisado o tempo passado na câmara direita (figura 13), onde estava o rato 2 apenas no *round 2*, os resultados mostraram que os animais expostos à SAL no pré-natal (SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.); SAL + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.); SAL + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.); SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.)), passaram mais tempo na câmara direita no *round 2*, onde estava o rato 2, em comparação a eles mesmos no *round 1* (quando ainda não havia sido incluído o rato 2 no teste).

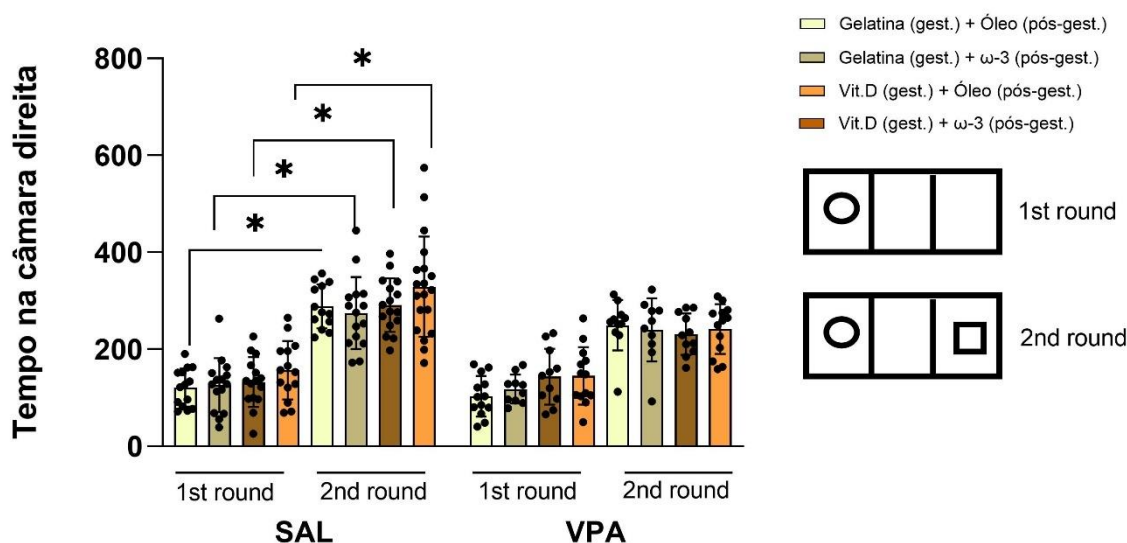


Figura 13 – Tempo na câmara direita no teste das três câmaras. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal no tempo passado na câmara direita, com distinção de *rounds*, realizado no 35º DPN. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 10-19$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS DO ENCÉFALO DA PROLE

Após o último teste comportamental, os animais foram eutanasiados por guilhotina e então foram dissecados o córtex posterior e o cerebelo, além de extraído cerca de 1,5 mL de sangue. No córtex posterior e no cerebelo foram realizadas análises de parâmetros de estresse oxidativo, como a oxidação do DCFH-DA, os conteúdos de sulfidrilas, a atividade da enzima SOD e da enzima CAT. Ainda no córtex, foram dosados os níveis de NGF, BDNF e TNF. Já o sangue, após centrifugado, foi dosado os níveis de TNF do soro.

4.3.1 Parâmetros de estresse oxidativo

Na figura 14, estão apresentados os resultados de oxidação de DCFH-DA (figura 14a); conteúdos de sulfidrilas (figura 14b); atividade da CAT (figura 14c) e

atividade da SOD (figura 14d) do córtex posterior. Observa-se, na figura 14a, que houve um aumento significativo nos níveis de oxidação de DCFH-DA no córtex posterior de ratos do grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.), em relação SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,01$). Além disso, o grupo VPA + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.), apresentou níveis de oxidação de DCFH-DA significativamente maior em relação aos grupos VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.) e VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,001$). No entanto, o tratamento com Vit.D isolada ou associação ao ω -3 (VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.) e VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.)), conseguiu diminuir de forma significativa a oxidação de DCFH-DA em comparação ao grupo VPA + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.).

Outro parâmetro de dano oxidativo observado no córtex, é o conteúdo de sulfidrilas (figura 14b). Houve uma tendência ($p = 0,08$) a diminuição no conteúdo de sulfidrilas no grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.), quando comparado à prole SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.). Não houve diferenças significativas entre os outros grupos experimentais neste parâmetro.

Analisando a enzima antioxidante CAT (figura 14c), foi verificada atividade significativamente reduzida no grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.), em comparação ao grupo SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,05$). Além disso, o grupo VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) também apresentou atividade reduzida, quando comparado à prole VPA + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,05$). Por fim, houve um aumento significativo da atividade de enzima CAT no córtex posterior dos animais do grupo SAL + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.), comparado ao grupo SAL + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,05$).

Por fim, ainda no córtex posterior, mas agora analisando a atividade da SOD (figura 14d), houve uma tendência ($p = 0,06$) a uma maior atividade da enzima SOD no grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.), se comparado ao grupo SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.). Além disso, o grupo SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) mostrou atividade da SOD significativamente maior do que os grupos SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,01$), SAL + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,05$) e VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,05$). Os animais expostos ao VPA e tratados apenas com Vit.D (VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.)), mostraram redução da atividade da SOD ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.). Já o grupo exposto ao VPA e à suplementação combinada de Vit. D e ω -3, mostrou diminuição da atividade enzimática, em relação aos grupos

SAL + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.) e SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,01$, para ambas as comparações).

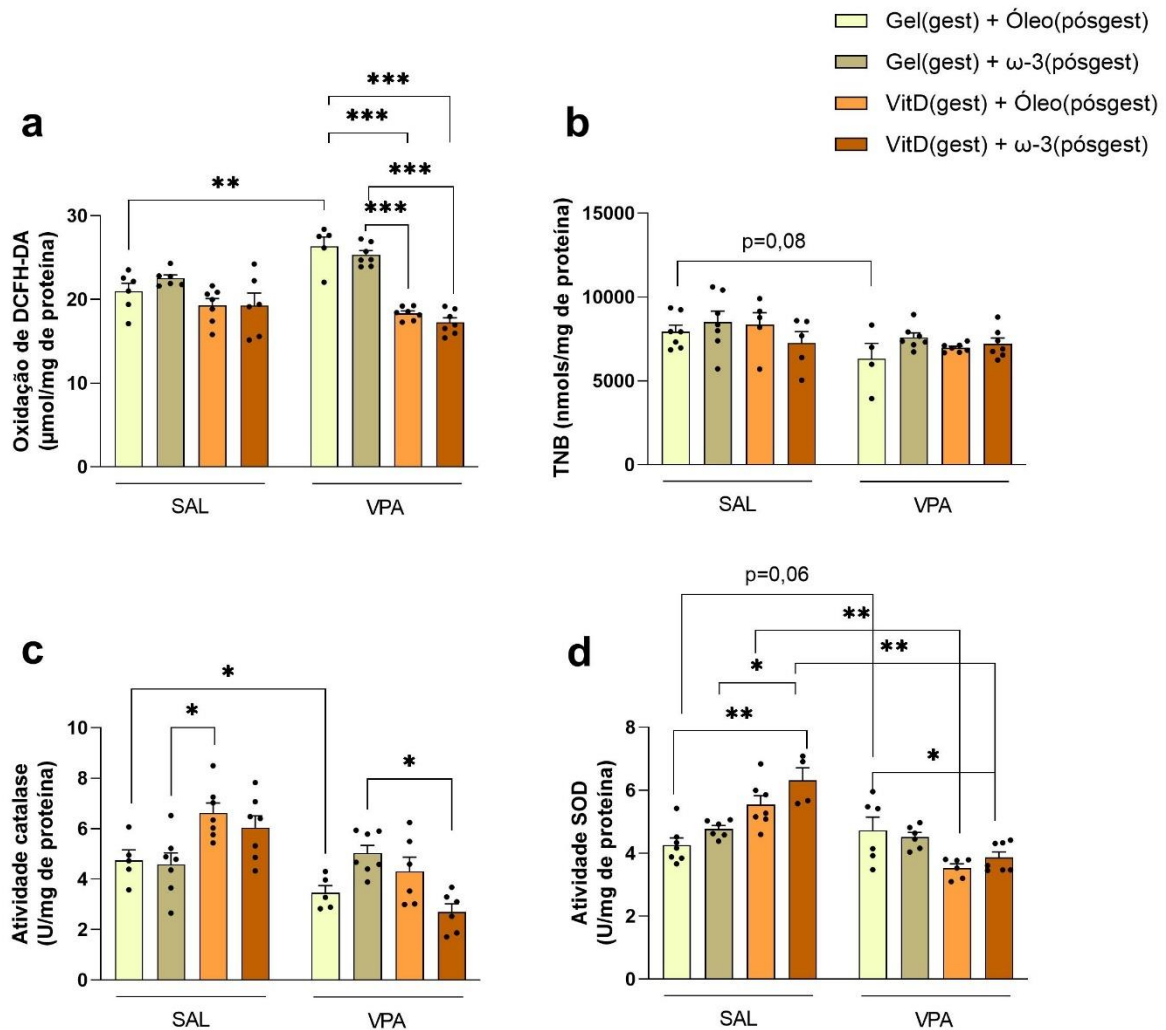


Figura 14 – Parâmetros de estresse oxidativo no córtex posterior. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal nos parâmetros de estresse oxidativo no córtex posterior de ratos machos. **a)** Oxidação de DCFH-DA ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína), **b)** conteúdo de sulfidrilas (nmol de TNB/mg de proteína), **c)** Atividade da enzima CAT (U/mg de proteína) e **d)** Atividade da enzima SOD (U/mg de proteína). As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 4-7$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Os parâmetros investigados no cerebelo, estão presentes na figura 15. Inicialmente, não foi encontrado diferenças significativas tanto na oxidação do DCFH-DA (figura 15a), quanto no conteúdo de sulfidrilas (figura 15b). Em contrapartida, na atividade da enzima CAT (figura 15c) houve algumas diferenças significativas. O grupo do modelo animal de TEA, sem suplementação com Vit.D ou ω -3, mostrou aumento significativo na atividade enzimática quando comparado aos grupos SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,01$), VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,01$) e VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) (0,05). Nos grupos expostos ao VPA na gestação e que receberam a suplementação com Vit.D isolada (VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.)) ou associada ao ω -3 (VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.)), mostram tendência ($p = 0,06$) e diminuição significativa ($p < 0,05$), quando comparados aos seus controles (SAL + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest. e SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.)), respectivamente).

Na atividade da SOD (figura 15d), foi verificado que o grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) mostrou atividade estatisticamente elevada em comparação aos grupos SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,01$), VPA + Vit. D (gest.) + Óleo (pós-gest.) ($p < 0,01$), VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,001$) e VPA + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.) ($p < 0,001$).

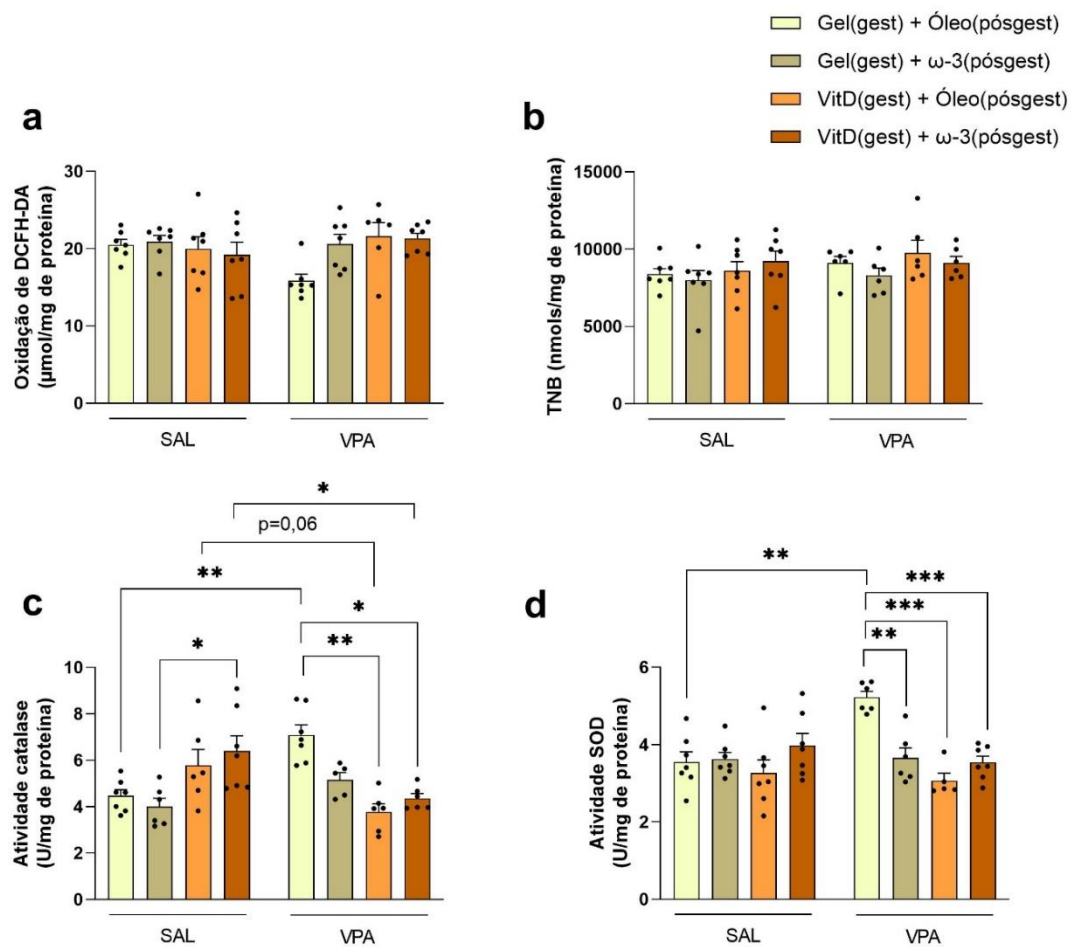


Figura 15 – Parâmetros de estresse oxidativo no cerebelo. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal nos parâmetros de estresse oxidativo no cerebelo de ratos machos. **a)** Oxidação de DCFH-DA ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína), **b)** conteúdo de sulfidrilas (nmol de TNB/mg de proteína), **c)** Atividade da enzima CAT (U/mg de proteína) e **d)** Atividade da enzima SOD (U/mg de proteína). As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 4-7$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Em relação aos níveis de TNF (figura 16a), houve uma diminuição significativa apenas no grupo VAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.), em comparação à prole SAL + Vit. D (gest.) + ω -3 (pós-gest.), no soro dos animais (figura 16b). Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais na região do córtex posterior.

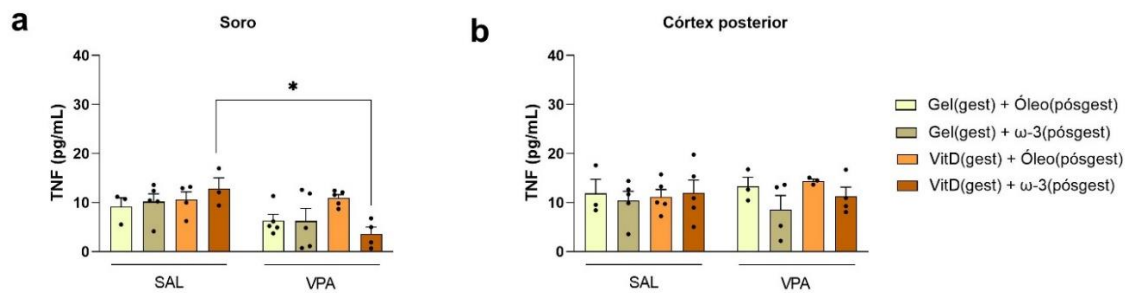


Figura 16 – Níveis de TNF. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal nos níveis de TNF (pg/mL) no soro e córtex posterior de ratos machos. **a)** Níveis de TNF (pg/mL) no soro e **b)** Níveis de TNF (pg/mL) no córtex posterior. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 3-5$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo adjacente ao colchete. Fonte: A autora.

Por fim, nos níveis de NGF (figura 17a) e BDNF (figura 17b), dosados no córtex posterior, não foi encontrado diferenças significativas entre os grupos experimentais.

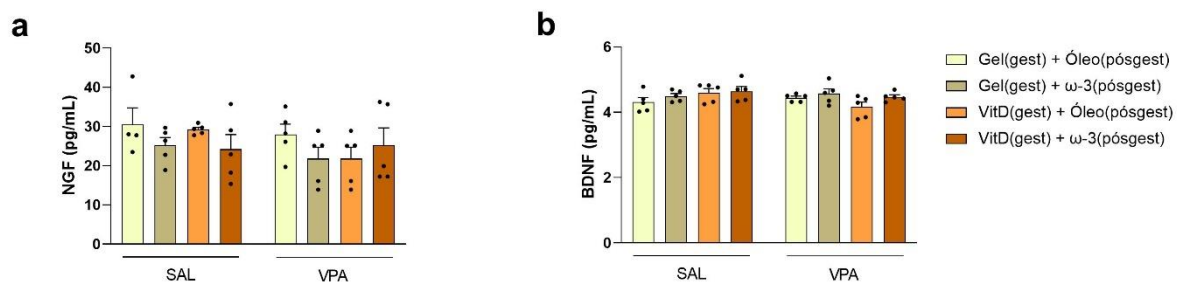


Figura 17 – Níveis de neurotrofinas. Efeito da exposição pré-natal à vitamina D e VPA, e óleo de coco e ômega 3 pós-natal nos níveis de neurotrofinas no córtex posterior de ratos machos. **a)** Níveis de TNF (pg/mL) no soro e **b)** Níveis de TNF (pg/mL) no córtex posterior. As proles foram divididas por grupos: prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e SAL na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina CT e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com óleo de coco no período pós-natal; prole vinda de matrizes expostas a gelatina suplementada com Vit. D e VPA na gestação e, tratada com ômega-3 no período pós-natal. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média ($n = 3-5$ animais por grupo) e as análises estatísticas foram conduzidas utilizando análise de variância ANOVA de três vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. Fonte: A autora.

5. DISCUSSÃO

O TEA é uma condição do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits persistentes na comunicação social e pela presença de padrões de comportamento restritos e repetitivos (Zahedi et al., 2023). Embora inicialmente tenha sido documentado como uma condição rara por Leo Kanner (1943), atualmente acomete cerca de 1–2% da população brasileira e mundial, com perspectiva de aumento (IBGE, 2025; Zeidan et al., 2022). O TEA incide sobre indivíduos de todas as origens raciais, étnicas e socioeconômicas (Shen et al., 2023), e suas causas envolvem complexa interação entre fatores genéticos e ambientais (Ostrowski et al., 2024).

Nos últimos anos, têm-se destacado fatores como inflamação sistêmica, estresse oxidativo, disfunções gastrointestinais e alimentares como contribuintes importantes na fisiopatologia do TEA (Baraskewich et al., 2021; Davoli-Ferreira et al., 2021; Gonçalves et al., 2024; Lin et al., 2024; Usui et al., 2023). Nesse contexto, deficiências nutricionais maternas durante o período gestacional e perinatal vêm sendo apontadas como potenciais fatores de risco, sendo que a suplementação alimentar, sobretudo com nutrientes neuroprotetores como vitamina D e ácidos graxos ω -3, tem sido proposta como estratégia preventiva e terapêutica promissora (García-Serna et al., 2020; Georgieff et al., 2018).

A vitamina D e o ω -3 possuem funções fundamentais para o desenvolvimento cerebral pré-natal e PN, incluindo a neurogênese, diferenciação e migração neuronal, conectividade axonal e sinaptogênese, frequentemente alterados no TEA (Eyles et al., 2013; Innis et al., 2008; Nevins et al., 2021). A literatura tem demonstrado que a suplementação com vitamina D durante a gestação pode atenuar alterações comportamentais associadas ao TEA, enquanto o uso de ω -3 em indivíduos diagnosticados com TEA tem mostrado efeitos positivos sobre aspectos comportamentais e cognitivos (Du et al., 2015; Nevins et al., 2021).

Tendo em vista estas duas formas isoladas de tratamento e que os mecanismos nos quais eles estão envolvidos são muitas vezes afetados no TEA, o presente estudo investigou os efeitos comportamentais e bioquímicos do uso associado da Vit.D no período gestacional (500 UI, via oral, 1 vez ao dia, por 21 dias gestacionais) e do ω -3 (300 mg/Kg de DHA e 450 mg/Kg de EPA, 1 vez ao dia, por 21 dias) entre o 14° e 34° DPN em um modelo animal de autismo induzido quimicamente.

Neste estudo, utilizou-se um modelo animal induzido por VPA, um modelo amplamente validado e replicável para estudos pré-clínicos sobre o TEA (Chomiak et al., 2013, Mabunga et al., 2015, Zarate-Lopez et al., 2024). O VPA é um ácido graxo de cadeia curta, que embora seja amplamente utilizado como um medicamento antiepiléptico e estabilizador de humor (Li et al., 2021; Romoli et al., 2019; Suliman et al., 2021), apresenta efeitos teratogênicos importantes quando administrado em altas doses durante a gestação. Entre os mecanismos envolvidos estão a inibição de canais de cálcio, deficiência de folato, dano celular, alteração das defesas antioxidantes, falhas no fechamento do tubo neural e inibição da atividade da histona desacetilase (HDAC), afetando diretamente a expressão gênica, diminuindo a proliferação celular e aumentando a apoptose celular em áreas cerebrais críticas (Hsieh et al., 2012; Moldrich et al., 2013; Nicolini e Fahnstock, 2018; Ferreira et al., 2024).

Diante de todos estes mecanismos biológicos afetados, o VPA pode levar à diversas alterações na bioquímica do sistema nervoso central e periferia e na maturação encefálica. Isto afeta o neurodesenvolvimento, além de impactar no crescimento corporal dos animais e conseqüentemente no comportamento social e exploratório. No presente estudo, os parâmetros de neurodesenvolvimento e crescimento dos animais foram avaliados pela análise do ganho de peso (DPN 9-34), busca pelo ninho (DPN 10) e geotaxia negativa (DPN 14). A pesagem foi inicialmente realizada por ninhada (DPN 9), e posteriormente de forma individualizada a partir do DPN 14.

Os dados obtidos revelaram que todos os grupos ganharam peso ao longo do estudo (9º ao 34º DPN). Esses achados corroboram estudos anteriores que demonstraram que a exposição gestacional a 600 mg/Kg de VPA, não prejudica o ganho de peso da prole (Costa et al., 2025; Schwingel et al., 2023; Bambini-Junior et al., 2011). Apesar da consistência desses achados, há controvérsia na literatura quanto ao impacto do VPA sobre o peso corporal. Alguns estudos observaram diferenças significativas no ganho de peso quando comparado a controles (Jaiswal, 2016; Elnahas et al., 2022). Favre et al. (2013) sugerem que esse tipo de discrepância pode estar relacionado a variáveis como o número de filhotes por ninhada e a densidade populacional nas gaiolas. No presente estudo foi adotada uma metodologia cuidadosa para que houvesse uma média de 5 filhotes para cada matriz e, após o desmame, foi mantido 4 a 5 animais por caixa, com o objetivo de minimizar o viés relacionado à competição alimentar.

Curiosamente, a suplementação com Vit.D— isoladamente ou associada ao ω -3 — parece ter promovido uma modulação mais eficaz dos efeitos do VPA sobre o crescimento corporal, em comparação ao ω -3 isolado. A modulação do peso pela vitamina D é incerta e discrepante da literatura. Chen et al. (2023) observaram aumento do peso da prole em resposta à suplementação gestacional com vitamina D, enquanto Sitar et al. (2024), utilizando um modelo com dieta deficiente em vitamina D, não encontraram alterações significativas. Tal divergência pode ser atribuída à dose administrada, ao tempo de suplementação (pré vs. pós-natal), à biodisponibilidade ou à interação com outros nutrientes, como cálcio e fósforo, ou mesmo ao status inflamatório materno.

A dosagem dos níveis séricos de 25(OH)D, principal metabólito circulante da vitamina D, revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais, especialmente nas matrizes. Nossos dados demonstraram que a exposição gestacional ao VPA resultou em redução significativa dos níveis de 25(OH)D no soro materno, mesmo com a coleta ocorrendo 21 dias após o parto, quando a suplementação nutricional já havia sido encerrada. Essa diminuição foi observada em comparação ao grupo controle (Gelatina+SAL), sugerindo que os efeitos do VPA sobre o metabolismo da vitamina D persistem mesmo após o fim da exposição e do período gestacional.

Esse achado é relevante, considerando que o VPA é reconhecidamente capaz de interferir no metabolismo hepático, afetando tanto a síntese quanto a ativação da vitamina D, o que pode ocorrer por mecanismos como indução de enzimas hepáticas e modulação epigenética (Vorhees, 1987; Podgorac et al., 2022). A literatura clínica também corrobora essa evidência: uma meta-análise conduzida por Xu et al. (2019) demonstrou que indivíduos com epilepsia em tratamento crônico com VPA apresentam níveis significativamente mais baixos de 25(OH)D do que indivíduos saudáveis, reforçando o potencial do fármaco em comprometer o status vitamínico mesmo após exposições prolongadas.

A suplementação materna com vitamina D foi capaz de atenuar parcialmente a queda dos níveis séricos de 25(OH)D nas matrizes expostas ao VPA, evidenciando um possível efeito protetor dessa intervenção. No entanto, o efeito não foi restaurador completo, o que pode estar relacionado ao tipo de composto utilizado (vitamina D3 - colecalciferol), à dose administrada, ao tempo de suplementação, ou ainda à biodisponibilidade intestinal reduzida sob ação do VPA. Por outro lado, quando

avaliados os níveis de 25(OH)D na prole no 35º DPN, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Este resultado indica uma regulação metabólica independente na prole (Royer, 1984). Essa independência metabólica sugere uma regulação ativa por parte do feto, que pode modular seu crescimento e desenvolvimento mesmo na presença de variações nos níveis maternos durante a lactação.

A literatura descreve que a transferência de vitamina D da mãe para a prole durante a gestação mostrou-se um processo importante para o desenvolvimento fetal. Clements e Fraser (1988) demonstraram que a vitamina D é ativamente transportada para o feto, com aumento progressivo nas concentrações de seus metabólitos durante a fase final da gestação. Esse mecanismo ressalta a importância do status materno de vitamina D para o acúmulo fetal, particularmente no tecido muscular, sendo o suprimento pré-natal mais determinante que a ingestão pós-natal via leite materno (Clements & Fraser, 1988).

Do ponto de vista translacional, estudos em humanos têm demonstrado resultados variados quanto à associação entre vitamina D e risco de TEA. O estudo de coorte de Schmidt et al. (2019) não mostrou associação geral entre níveis de 25(OH)D neonatal e TEA, quando analisado 357 crianças com TEA, no entanto encontrou uma diferença entre sexos, quando um aumento de 25 nmol/L de 25(OH)D neonatal, foi associado a 26% menos chance de TEA em meninas, sugerindo neuroproteção do sexo. Já Wu et al. (2018), utilizando uma amostra de 330 crianças chinesas, encontraram níveis significativamente mais baixos no nascimento, além de um risco de 3,7 vezes maior para o TEA. Estudos com crianças e adolescentes reforçam esse padrão, frequentemente relatando concentrações mais baixas de vitamina D em indivíduos com TEA do que em indivíduos neurotípicos (Arastoo et al., 2018; Bener et al., 2017).

Outro aspecto relevante se refere à forma da vitamina D utilizada na suplementação. Gázquez et al. (2022) e Quesada-Gomez e Bouillon (2018) evidenciaram que o calcifediol (25(OH)D₃), metabólito direto da vitamina D₃, apresenta vantagens farmacocinéticas importantes em relação ao colecalciferol (utilizando neste estudo). O calcifediol mostrou maior eficácia na elevação das concentrações plasmáticas tanto na mãe quanto no feto. Portanto, o uso de colecalciferol no presente estudo pode ter limitado, em parte, os efeitos da suplementação.

O resultados do presente estudo demonstraram, de forma consistente com a literatura, que a exposição pré-natal ao VPA prejudica o neurodesenvolvimento dos animais. O VPA induziu diferenças significativas no tempo para chegar ao ninho entre os grupos experimentais no teste de busca pelo ninho, realizado no 10º DPN. A prole Gelatina+VPA, apresentou aumento significativo na latência para localização do ninho materno, em comparação ao grupo Gelatina+SAL. Isso mostra que os animais do modelo animal de autismo apresentam prejuízo no amadurecimento do sistema olfatório, responsável pelo reconhecimento dos odores maternos, essencial nos primeiros dias de vida para a sobrevivência e integração da prole.

Tais achados estão em consonância com estudos prévios que utilizaram o mesmo modelo experimental de autismo, nos quais foram observadas disfunções olfatórias associadas a prejuízos no amadurecimento do bulbo olfatório e em regiões límbicas associadas ao processamento sensorial e comportamento social (Favre et al., 2013; Schneider & Przewlocki, 2005; Ruhela et al., 2019; Costa et al., 2025). O prejuízo no sistema olfatório ultrapassa o olfato propriamente dito e atinge questões mais instintivas, como orientação e agrupamento dos filhotes em relação à matriz e ninhada, interações sociais e memória do animal (Haratizadeh et al., 2020). Portanto, déficits neste sistema podem comprometer formação de vínculos sociais, os quais são frequentemente prejudicados em modelos animais de TEA (Roulet et al., 2010).

Outro parâmetro de neurodesenvolvimento avaliado, foi o desempenho na geotaxia negativa, no 14º DPN. Este teste é baseado na expressão dos efeitos deletérios do VPA sobre a maturação do hipocampo e cerebelo (Yochum et al., 2008), refletidos no desenvolvimento motor precoce, capacidade de agir com reflexo, atividade e função do sistema vestibular (Ruhela et al., 2019) e função sensorial (Motz e Alberts, 2005). De maneira semelhante ao observado no teste olfatório, os animais do grupo VPA não suplementado apresentaram latência significativamente maior para girar no plano inclinado, assim como em estudos anteriores (Nakasato et al., 2008; Ruhela et al., 2019; Schwingel et al. 2023). Este achado se alinha com as observações de Olexová et al. (2013) sobre a habituação exploratória prejudicada e com os resultados de Piri et al. (2024) quanto aos déficits de coordenação motora em modelos animais de TEA.

De modo interessante, nos dois testes (busca pelo ninho e geotaxia), quando o grupo VPA foi suplementado com Vit.D, houve uma reversão destes déficits comportamentais, sendo que animais tratados com Vit.D (na gestação) conseguiram

completar as atividades em tempo significativamente menor. Esses achados fortalecem a hipótese de que a vitamina D exerce papel neuroprotetor durante o desenvolvimento, minimizando os efeitos deletérios da exposição intrauterina ao VPA. Esses achados se alinham com a literatura. Yates et al. (2018) e Tamang et al. (2023), que relacionam a deficiência de vitamina D com alterações no comportamento materno e aumento de vocalizações ultrassônicas na prole, respectivamente. Além disso, a vitamina D parece exercer um papel na modulação de vias dopaminérgicas e de resposta ao estresse (Yates et al., 2018). Neste estudo, estas vias podem estar prejudicadas pelo VPA. Os mecanismos subjacentes a esses efeitos parecem envolver múltiplos sistemas, incluindo alterações no processamento e integração sensorial (Dendrinós et al., 2011; Olexová et al., 2013).

Após a suplementação combinada de vitamina D gestacional e ω -3 no pós natal, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto e ao teste das três câmaras. Os resultados do teste de campo aberto revelaram padrões comportamentais distintos entre os grupos experimentais. Observou-se uma diminuição do número de levantamentos nos grupos VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) e VPA + Gelatina (gest.) + ω -3 (pós-gest.). Esses dados indicam que a exposição ao VPA no período gestacional compromete o comportamento exploratório dos animais e que o tratamento com ω -3 não foi suficiente para reverter esse prejuízo. Em contraste, a suplementação gestacional com vitamina D durante a gestação isolada ou associada ao ω -3 no PN, preveniu essa redução na exploração vertical, sugerindo efeito protetor da vitamina D.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no número de cruzamentos, indicando que a locomoção geral não foi afetada. O teste de campo aberto é utilizado para avaliação do comportamento exploratório, ansiedade e capacidade locomotora, sendo que animais doentes se movem menos no aparato (Costa et al., 2025; Kraeuter et al., 2019). Estudos prévios sugerem que o VPA prejudica o comportamento exploratório vertical (Costa et al., 2025; Jaiswa, 2016; Vorhees, 1986), mas não compromete a atividade locomotora geral (número de cruzamentos) (Costa et al., 2025). A suplementação com vitamina D, isolada ou combinada com o ω -3, demonstrou potencial para atenuar estes efeitos deletérios do VPA. Pesquisas como as de Schavinski et al. (2024) e Salih e Ahmed (2020), apoiam estes achados e hipotetizam que a modulação cognitiva pela vitamina D e doses moderadas de omega-3, podem exercer melhora da exploração vertical,

enquanto doses elevadas podem ter efeito oposto. Além disso, a melhora no desempenho observada nos grupos suplementados com vit.D e ω -3 corrobora com os achados de Pan et al. (2013) sobre a modulação comportamental pela vit.D e de Jackson et al. (2016), quanto aos efeitos do ω -3 na reatividade à novidade.

O principal sinal do TEA é o déficit na interação e comunicação social (APA, 2023). Para investigar esse aspecto no modelo de autismo induzido por VPA e suplementado com vitamina D isolada ou em associação com o ω -3, os animais foram submetidos ao teste das três câmaras. O teste é baseado na biologia animal, sendo que os ratos são seres curiosos e sociáveis, havendo uma tendência natural de investigar animais desconhecidos e/ou intrusos. Além disso, os roedores normalmente tendem a ficar próximos uns dos outros (teoria da sociabilidade) e quando há possibilidade de contato com um roedor desconhecido, existe a preferência por interagir com o animal novo do que com aquele que já é conhecido (teoria da novidade social) (Kaidanovich-Beilin et al., 2011). Tendo essas premissas como base, o teste das três câmaras pode auxiliar na identificação de déficits sociais em roedores.

As proles expostas ao VPA durante a gestação apresentaram déficits claros no comportamento social. A suplementação com vitamina D e/ou ω -3, não foi suficiente para reverter esses efeitos. Em animais saudáveis, expostos à SAL durante a gestação, é esperado que busquem rapidamente o contato com os ratos 1 e 2, como uma demonstração de sociabilidade e preferência por novidade social. Esta última, está relacionada com a disposição de passar mais tempo na câmara onde o animal novo está. Ou seja, passar mais tempo na câmara esquerda durante o *round 1*, visto que existe apenas um animal desconhecido no aparato e durante o *round 2*, passar mais tempo na câmara direita, onde é colocado o rato 2 apenas nos últimos 10 minutos. Desta forma, no *round 2*, o rato 2 é uma novidade social para o rato teste. Ademais, é natural que os animais expostos à SAL interajam mais com o rato 1 durante o *round 1* e menos durante o *round 2*, visto que no *round 2* há um animal desconhecido para explorar.

Conforme esperado, a exposição da prole ao VPA levou a um aumento nas latências para o primeiro encontro com o rato 1 e 2. Não o bastante, os animais VPA não demonstraram preferência em passar mais tempo na câmara esquerda durante o *round 1*, período que havia apenas o rato 1 para explorar. Isso demonstra que os animais do modelo de autismo não apresentaram comportamento de interesse social. Além disso, as proles expostas ao VPA também não exibiram interesse em novidade

social, visto que não houve diferença significativa entre os *rounds* no tempo passado na câmara direita, onde havia o rato 2 apenas no *round 2*. Por fim, os animais VPA não manifestarem interesse em interagir por mais tempo com o rato 1 em nenhum dos *rounds*. Tomados esses dados em conjunto, esses dados indicam prejuízo na sociabilidade e na preferência por novidade social, reforçando a validade do modelo de TEA (Cezar et al., 2024; Costa et al., 2025; Elnahas et al., 2022; Jaber, 2023; Lu et al., 2024; Piri et al., 2023; Xu et al., 2024).

A suplementação com Vit.D isolada atenuou apenas um dos parâmetros avaliados no teste das três câmaras, que foi a latência para o primeiro encontro com o rato 2. Isso indica que a vitamina D, mesmo suplementada apenas durante a gestação, pode exercer efeitos na adolescência da prole. No entanto, com atenuação de apenas um dos parâmetros, não é possível afirmar que a vitamina D exerça efeitos positivos gerais sobre a sociabilidade no modelo de TEA. Uma revisão sistemática reforça esse achado, mostrando que a administração de vitamina D pode melhorar a hiperatividade no TEA, mas não atua diretamente sobre déficits sociais (Li et al., 2022). Somado a isto, um ensaio clínico randomizado, relatou que a suplementação no terceiro trimestre não está associada a melhores desfechos de neurodesenvolvimento até os 6 anos (Sass et al., 2020).

Em relação ao $\omega-3$, não foram observados efeitos significativos sobre os parâmetros sociais avaliados. Em contraste, estudos com outros modelos de TEA, como camundongos e ratos nocaute para *Fmr1*, demonstraram que o $\omega-3$ administrado no período perinatal pode resgatar vocalizações ultrassônicas, interação social, hiperatividade e memória (Nolan et al., 2021; Nolan et al., 2020; Schiavi et al., 2022). No entanto, uma revisão sistemática concluiu que há pouca evidência de que a suplementação com $\omega-3$ (especificamente o DHA) durante a gestação e lactação melhore significativamente o neurodesenvolvimento da prole (Nevins et al., 2021), salientando a baixa qualidade e o pequeno tamanho amostral dos ensaios clínicos disponíveis.

Além do déficit comportamental, os indivíduos com TEA também apresentam alterações a nível molecular, como um aumento da inflamação e estresse oxidativo (Chauhan e Chauhan, 2006 e 2015). Neste estudo, foram analisados os parâmetros inflamatórios (TNF) no córtex posterior e no soro; as neurotrofinas (BDNF e NGF) foram dosadas apenas no córtex posterior; e os parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo foram avaliados no córtex posterior e no cerebelo. Para este

último, utilizaram-se técnicas que mensuram a oxidação de DCFH-DA, o conteúdo de grupamentos sulfidríla, bem como a atividade das enzimas CAT e SOD.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de TNF no córtex posterior e soro dos animais exposto ao VPA. Outro estudo também não identificou alterações nos níveis de TNF em machos, apenas de fêmeas (Campos et al., 2024), indicando que possa existir uma distinção sexual no fenótipo de TEA. Na clínica, os indivíduos do sexo masculino costumam expressar comportamentos típicos do transtorno, enquanto o sexo feminino demonstra sinais mais internalizados e alterações a nível celular e molecular exacerbados (Floris et al., 2018; Lai et al., 2013; Zeestraten et al., 2017).

Contrariando estudos anteriores, os níveis de BDNF não foram alterados mediante exposição pré-natal ao VPA e às suplementações com vitamina D e ω -3. O desenvolvimento do córtex fetal é regulado pela sinalização do BDNF. Proliferação neuronal anormal e desenvolvimento cortical desregulado foram encontrados quando foi aumentado ou diminuído a sinalização do BDNF em camundongos *in utero* (Bartkowska et al., 2007; Fukimitsu et al., 2006). O estudo de Almeida e colaboradores (2014), ao utilizar o modelo VPA, identificou que existe um aumento transitório exorbitante da expressão de BDNF no cérebro fetal, mas não foi investigado este mesmo parâmetro na fase de desenvolvimento correspondente à idade dos animais deste estudo. Além disso, não existem estudos prévios investigando neurotrofinas após suplementação com vitamina D isolada ou associado ao ω -3 em modelos de autismo ou com indivíduos autistas. No entanto, em um estudo clínico com participantes depressivos, não houve mudanças significativas de BDNF após suplementação associada com os dois nutrientes (Fuentealba et al., 2019; Vyas et al., 2023).

Os níveis de oxidação de DCFH-DA são indicadores de produção de espécies reativas, principalmente peróxido de hidrogênio. No córtex posterior, foram encontrados níveis maiores de oxidação de DCFH-DA nos animais expostos somente ao VPA. O tratamento com ω -3 não exerceu melhora significativa. No entanto, o uso da vitamina D isolada ou em associação com o ω -3 atenuou este parâmetro alterado pelo VPA, indicando efeito positivo sobre espécies reativas de oxigênio. De forma semelhante a isto, houve uma tendência de diminuição nos conteúdos de sulfidrílas no grupo VPA + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.) em comparação ao grupo SAL + Gelatina (gest.) + Óleo (pós-gest.), sugerindo oxidação do grupos sulfidrílas por

radicais livres (Mironczuk-Chodakowska e Witkowska, 2018). No cerebelo, não houve diferença significativa nesses parâmetros.

Em relação às enzimas antioxidantes, foi verificada diminuição da atividade da CAT e tendência ao aumento da atividade da SOD, no córtex posterior dos animais VPA, indicando alteração no sistema antioxidante. A suplementação com vitamina D isolada ou associada ao $\omega-3$, não recuperou a atividade enzimática no córtex. No entanto, no cerebelo, a atividade de CAT e SOD estava aumentada com o VPA, sendo normalizada após o tratamento com vitamina D, isoladamente ou em combinação. Estes dados indicam que o VPA foi capaz de induzir dano oxidativo no córtex posterior e alteração no sistema antioxidante no córtex posterior e cerebelo. O tratamento com vitamina D isolada ou em associação com o $\omega-3$ foi capaz de reverter o dano oxidativo no córtex posterior e as alterações no sistema antioxidante do cerebelo.

O aumento de oxidação de DCFH-DA (Campos et al. 2024), diminuição do conteúdo de sulfidrilas (Campos et al. 2024; Costa et al., 2025) bem como a alteração na atividade de enzimas antioxidantes como CAT e SOD (Campo et al. 2024; Elnahas et al., 2021; Gao et al., 2016; Khongrum et al., 2015; Wong e Giulivi 2016) já foram visualizados em córtex e cerebelo em estudos anteriores utilizando modelos animais de TEA. Contudo, dependendo da região estudada, não são encontradas diferenças significativas nestes parâmetros (Campos et al. 2024; Costa et al., 2025; De Mattos et al., 2020). Na clínica, os achados também são inconsistentes, com relatos de aumento, redução ou ausência de alterações nas atividades de SOD e CAT em indivíduos autistas (Al-Yafee et al., 2011; Golse, 1978; Söğüt et al., 2003; Knivsberg et al., 2002; Vergani et al., 2011; Yorbik et al., 2002).

Os animais VPA apresentam desbalanço entre o dano oxidativo e a defesa antioxidante, o que é caracterizado como estresse oxidativo (Chirumbolo & Bjørklund, 2017; Pangrazzi et al., 2020). O cérebro é o órgão mais vulnerável ao estresse oxidativo devido à sua limitada capacidade antioxidante, alta demanda de energia e alto teor de lipídios insaturados e ferro. Além disso, as crianças são mais vulneráveis ao estresse oxidativo do que os adultos, o que pode resultar em distúrbios do neurodesenvolvimento, como o TEA (Bjørklund et al. 2020; Liu et al., 2022).

As propriedades antioxidantes da vitamina D podem ser contempladas a partir da expressão de enzimas mitocondrias, promoção da síntese de glutathione e inibindo enzimas envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio especialmente em células astrocíticas (Eyles et al., 2007; Garcion et al., 1999). Estudos mostram que a

suplementação de Vit. D pode reduzir não apenas citocinas pró-inflamatórias, mas também a gravidade do TEA (Saad et al., 2016). Além disso, a vitamina D exerce resposta anti-inflamatória em diversos tecidos, incluindo o encéfalo. Os mecanismos pelos quais exerce esta resposta, se dá pela inibição de citocinas pró-inflamatórias e indução da supressão da proliferação de células T (Priehl et al., 2013; Provvedini et al., 1983; Takahashi et al., 2002; Zhang et al., 2012).

Gao e colaboradores (2016), ao investigarem os efeitos do ω -3 (apenas DHA) em três doses diferentes (70, 150 e 300 mg/Kg) sobre os efeitos do VPA, identificaram que a dose mais alta foi a responsável por melhores efeitos na peroxidação lipídica e atividade das enzimas glutatona e SOD. Somado a isto, a maior dose foi capaz de diminuir a atividade da caspase-3, reduzindo a apoptose, melhorar a memória e o aprendizado. O estudo de Martinat et al., 2021 avaliou os efeitos de uma dieta isocalórica suplementada com aproximadamente 481,12 DHA e 703,99 EPA, mg/Kg de peso corporal/dia) durante a gravidez até a idade adulta da prole sob os efeitos do VPA em um modelo murino. Foi verificado que não houve aumento de DHA no cerebelo, indicando que o ω -3 não estava chegando nesta região e possivelmente por isso não exerceu papel antioxidante (Martinat et al., 2021). No estudo de Turpin e colegas (2023), não foi encontrado níveis de mRNA para TNF e TGF-beta no cerebelo dos animais expostos ao VPA e ω -3 na gestação até a idade adulta. Com base nesses estudos, hipotetizamos que o ω -3 pode não ter chegado a esta região encefálica e por isso não exerceu um papel antioxidante e anti-inflamatório. Contudo, isso não significa que não tenha potencial terapêutico em outras regiões do sistema nervoso central ou a nível periférico.

O córtex cerebral é responsável pelo controle das funções executivas cerebrais, incluindo processamentos cognitivos como tomada de decisão, memória de trabalho, emoções, comportamento social, aprendizagem e comunicação (Donavan e Basson, 2016). Já o cerebelo, desenvolve funções cognitivas, executivas e afetivas, além da motora (Van Overwalle et al., 2020, Wang et al., 2014). Além disso, esta estrutura está ligada a pensamento de ordem superior, como planejamento, formação de estratégias, aprendizado e linguagem (Wang et al., 2014). Sendo assim, a hipótese de Samson e Claassen (2017), é que o cerebelo auxilia nas interações sociais, sendo importante para a compreensão de como ocorre a sequência social. O estresse oxidativo pode afetar a comunicação intercelular e celular. Conseqüentemente, a

função dessas estruturas é prejudicada, levando aos comportamentos encontrados no TEA.

Diversos autores buscam justificar o padrão de deficiência de vitamina D em crianças com TEA. Evidências sugerem que indivíduos com predisposição genética a condições do neurodesenvolvimento e TEA adotam dietas mais restritas devido sua rigidez comportamental (Esteban-Figuerola et al., 2019; Smith et al., 2020; Yule et al., 2021), o que poderia, por sua vez, levar a níveis mais baixos de nutrientes. Somado a isto, a relação interpessoal e o compartilhamento de espaços ao ar livre com diversos estímulos são desafiadores para indivíduos com TEA, o que dificulta a exposição à luz solar (Wang et al., 2020). Além disso, não deve ser esquecido as disfunções gastrointestinais, na relação intestino-microbiota-cérebro alterada e que já foi identificada um diminuição dos receptores de vitamina D nesta população (Altun et al., 2018; Ogbu et al., 2020).

Ainda buscando identificar se a deficiência de vitamina D ocorre antes ou depois do transtorno, um estudo fez uma triangulação entre fatores genéticos maternos, paternos e dos filhos, através de uma randomização mendeliana. Dentro da metodologia abordada, os autores mostraram que não existem evidências suficiente para a deficiência nutricional de vitamina D e DHA na gestação se uma causa do TEA. No entanto, foi levantado a hipótese de que pode existir uma causalidade reversa, onde o transtorno leva a deficiências nutricional devido sua alimentação mais restrita e limitações sensoriais (Wootton et al., 2024).

O presente estudo apresentou algumas limitações que devem ser levadas em consideração. Como o TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento com sinais e sintomas que perpetuam ao longo da vida do indivíduo, os resultados não suportam extrapolação para todos os momentos da vida, uma vez que a biologia e o metabolismo se alteram com o tempo. Além disso, as análises bioquímicas (parâmetros de estresse oxidativo, TNF e neurotrofinas) foram limitadas ao córtex posterior, cerebelo e soro. No entanto, o TEA e a suplementação com vitamina D isolada ou associado ao ω -3, possivelmente atuam em outras vias e regiões. Desta forma, estudos futuros, podem investigar os efeitos do sinergismo entre vitamina D e ω -3 sobre outros parâmetros, em outras estruturas do sistema nervoso central e periférico, além da modulação do TEA por esta suplementação em diferentes idades.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a suplementação gestacional com Vit. D, isoladamente ou em associação ao ω -3, mostrou-se eficaz na atenuação de alguns dos efeitos comportamentais e bioquímicos induzidos pelo VPA. Especialmente, agiu na preservação do comportamento exploratório e na regulação das alterações bioquímicas causadas pelo VPA, com diminuição de dano oxidativo e regulação da atividade das enzimas antioxidantes em córtex posterior e cerebelo. Por outro lado, a suplementação isolada com ω -3 não foi eficaz na modulação dos comportamentos alterados pelo VPA no presente modelo e não potencializou os efeitos da Vit.D.

Esses dados reforçam a importância de investigações futuras voltadas à compreensão dos mecanismos envolvidos na ação da vitamina D e do ω -3 no neurodesenvolvimento, sociabilidade e outros comportamentos associados ao fenótipo do TEA. Estes estudos podem explorar as doses, o tempo de exposição, as possíveis sinergias entre esses nutrientes e as diferenças nos diferentes períodos da vida que a suplementação pode gerar em modelos de TEA.

REFERÊNCIAS

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 302, n. 2-3, p. 141-145, 2001.

ALFAWAZ, H. et al. Protective and restorative potency of Vitamin D on persistent biochemical autistic features induced in propionic acid-intoxicated rat pups. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014.

ALFAWAZ, H. et al. Comparative study on the independent and combined effects of omega-3 and vitamin B12 on phospholipids and phospholipase A2 as phospholipid hydrolyzing enzymes in PPA-treated rats as a model for autistic traits. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 205, 2018.

ALI, A. et al. The placental immune response is dysregulated developmentally vitamin D deficient rats: relevance to autism. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 180, p. 73-80, 2018.

ALTUN, Hatice et al. The levels of vitamin D, vitamin D receptor, homocysteine and complex B vitamin in children with autism spectrum disorders. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 383, 2018.

ALVES, A. K. S.; ALVES, T. S. O autismo e o psicólogo na psicologia clínica. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 2, 2022

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Fifth Edition, Text Revision**. Arlington: American Psychiatric Association, 2023.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR)**. 4th Editioed, 2000.

ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behavior of rats

using variations of the elevated plus-maze. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, p. 533-540, 1997.

ARASTOO, Ali Asghar et al. Evaluation of serum 25-Hydroxy vitamin D levels in children with autism Spectrum disorder. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 44, p. 1-5, 2018.

BAMBINI-JUNIOR, Victorio et al. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. **Brain research**, v. 1408, p. 8-16, 2011.

BARÓN-MENDOZA, I.; GONZÁLEZ-ARENAS, A. Relationship between the effect of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on brain plasticity and the improvement on cognition and behavior in individuals with autism spectrum disorder. **Nutritional Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 387-410, 2022.

BAXTER, A. J. et al. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. **Psychological Medicine**, v. 45, p. 601–613, 2015.

BENEDIK, Evgen. Sources of vitamin D for humans. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 2021.

BENER, Abdulbari et al. Iron and vitamin D levels among autism spectrum disorders children. **Annals of African medicine**, v. 16, n. 4, p. 186-191, 2017.

BOSA, C. A.; TEIXEIRA, M. C. T. V. (Orgs.). **Autismo: avaliação psicológica e neuropsicológica**. São Paulo: Hogrefe, 2017.

BOUILLON, Roger et al. Skeletal and extraskeletal actions of vitamin D: current evidence and outstanding questions. **Endocrine reviews**, v. 40, n. 4, p. 1109-1151, 2019.

BOUILLON, Roger; ANTONIO, Leen; OLARTE, Oscar Rosero. Calcifediol (25OH vitamin D3) deficiency: A risk factor from early to old age. **Nutrients**, v. 14, n. 6, p.

1168, 2022.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in Molecular Biology**, v. 108, p. 347-352, 1998.

BU, Fengxiao; ARMAS, Laura A. G.; LAPPE, Joan M.; ZHOU, Yu; GAO, Guimin; WANG, Hong Wei; RECKER, Robert R.; ZHAO, Lan Juan. Comprehensive association analysis of nine candidate genes with serum 25-hydroxy vitamin D levels among healthy Caucasian subjects. **Human Genetics**, v. 128, n. 5, p. 549-556, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00439-010-0881-9>. Acesso em: 29 maio 2025.

CÂMARA, J. L. et al. Vitamina D: uma revisão narrativa. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 5904-5920, 2021.

CANNELL, J. J. Vitamin D and autism, what's new?. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 18, n. 2, p. 183-193, 2017.

(CDC) C for DC and P. 2024. Autism Spectrum Disorder. [acesso em 04 Setembro 2024]. Available from <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/index.html>

CEZAR, L. C.; FONSECA, C. C.; KLEIN, M.; KIRSTEN, T. B.; FELÍCIO, L. F. Prenatal valproic acid induces autistic-like behaviors in rats via dopaminergic modulation in nigrostriatal and mesocorticolimbic pathways. **Journal of Neurochemistry**, v. 169, n. 1, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.16282>. Acesso em: 22 maio 2025.

CHALIHA, D. et al. A systematic review of the valproic-acid-induced rodent model of autism. **Developmental Neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 14-48, 2020.

CHAUHAN, Abha; CHAUHAN, Ved. Oxidative stress in autism. **Pathophysiology**, v. 13, n. 3, p. 171-181, 2006.

CHAUHAN, Abha; CHAUHAN, Ved. Increased vulnerability to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in autism. In: **The Molecular Basis of Autism**. New York,

NY: Springer New York, 2015. p. 407-425.

CHIEN, Mei-Chun et al. Effects of vitamin D in pregnancy on maternal and offspring health-related outcomes: An umbrella review of systematic review and meta-analyses. **Nutrition & Diabetes**, v. 14, n. 1, p. 35, 2024.

CHIRUMBOLO, Salvatore; BJØRKLUND, Geir. PERM hypothesis: the fundamental machinery able to elucidate the role of xenobiotics and hormesis in cell survival and homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 165, 2017.

CHOMIAK, Taylor; TURNER, Nathanael; HU, Bin. What we have learned about autism spectrum disorder from valproic acid. **Pathology research international**, v. 2013, n. 1, p. 712758, 2013.

CLEMENTS, M. R.; FRASER, D. R. Vitamin D supply to the rat fetus and neonate. **Journal of Clinical Investigation**, v. 81, n. 6, p. 1768–1773, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI113518>. Acesso em: 22 maio 2025.

CÔRTEZ, M. S. M.; ALBUQUERQUE, A. R. Contribuições para o diagnóstico do transtorno do espectro autista: de Kanner ao DSM-V. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 3, n. 7, 864-880, 2020.

COSTA, Maiara de Aguiar da et al. Effects of Cannabidiol Isolated or in Association With Risperidone in an Animal Model of Autism. **Developmental Neurobiology**, v. 85, n. 1, p. e22955, 2025.

CRUZ, A. P. M. et al. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p. 171-176, 1994.

DAVIES, M.; MAWER, E. B.; KRAWITT, E. L. Comparative absorption of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in intestinal disease. **Gut**, v. 21, n. 4, p. 287-292, 1980.

DAVOLI-FERREIRA, Marcela; THOMSON, Carolyn A.; MCCOY, Kathy D. Microbiota and microglia interactions in ASD. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 676255, 2021.

DEBORAH, L. C. et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 72, n. 2, p. 1–25, 2023.

DENDRINOS, G.; HEMELT, M. E.; KELLER, A. Prenatal VPA exposure and changes in sensory processing by the superior colliculus. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 5, p. 68, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnint.2011.00068>. Acesso em: 22 maio 2025.

DOAEI, S. et al. The effect of omega-3 fatty acids supplementation on social and behavioral disorders of children with autism: A randomized clinical trial. **Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 12–18, 2021.

DU, Lin et al. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D in children with autism spectrum disorders. **Zhongguo dang dai er ke za zhi= Chinese Journal of Contemporary Pediatrics**, v. 17, n. 1, p. 68-71, 2015.

DU, L. et al. Behavioral improvements in a valproic acid rat model of autism following vitamin D supplementation. **Psychiatry Research**, v. 253, p. 28-32, 2017.

ELNAHAS, Esraa M. et al. Novel role of peroxisome proliferator activated receptor- α in valproic acid rat model of autism: Mechanistic study of risperidone and metformin monotherapy versus combination. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 116, p. 110522, 2022.

ESTEBAN-FIGUEROLA, Patricia et al. Differences in food consumption and nutritional intake between children with autism spectrum disorders and typically developing children: A meta-analysis. **Autism**, v. 23, n. 5, p. 1079-1095, 2019.

EVÊNÇIO, K. M. M.; FERNANDES, G. P. História do autismo: compreensões iniciais.

Id on Line Revista Multidisciplinar e Psicologia, v. 13, n. 47, p. 133-138, 2019.

EYLES, Darryl W.; BURNE, Thomas HJ; MCGRATH, John J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 34, n. 1, p. 47-64, 2013.

EYLES, D. et al. Developmental vitamin D deficiency alters the expression of genes encoding mitochondrial, cytoskeletal and synaptic proteins in the adult rat brain. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 103, n. 3-5, p. 538-545, 2007.

FAVRE, Mônica R. et al. General developmental health in the VPA-rat model of autism. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, p. 88, 2013.

FERNANDES, C. S.; TOMAZELLI, J.; GIRIANELLI, V. R. Diagnóstico de autismo no século XXI: evolução dos domínios nas categorizações nosológicas. **Psicologia USP**, v. 31, e200027, 2020.

FERREIRA, Ana Luísa de Andrade Seguti et al. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão. **Journal Archives of Health**, v. 5, n. 3, p. e2186-e2186, 2024.

FLORIS, Dorothea L. et al. Network-specific sex differentiation of intrinsic brain function in males with autism. **Molecular autism**, v. 9, p. 1-12, 2018.

FUENTEALBA, Constanza R. et al. Region-specific reduction of BDNF protein and transcripts in the hippocampus of juvenile rats prenatally treated with sodium valproate. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 261, 2019.

FORTUNATO, J. J. et al. Effects of ω -3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharides. **Nutrition**, v. 35, p. 119-127, 2017.

FRASCH, M. G. et al. Autism Spectrum Disorder: A Neuro-Immunometabolic Hypothesis of the Developmental Origins. **Biology**, v. 12, n. 7, p. 1–13, 2023.

GAO, J. et al. Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid-induced rat autism model. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 49, p. 67-78, 2016.

GARCÍA-SERNA, Azahara M.; MORALES, Eva. Neurodevelopmental effects of prenatal vitamin D in humans: systematic review and meta-analysis. **Molecular psychiatry**, v. 25, n. 10, p. 2468-2481, 2020.

GARCION, E. et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates γ -glutamyl transpeptidase activity in rat brain. **Neuroscience letters**, v. 216, n. 3, p. 183-186, 1996.

GÁZQUEZ, A.; SÁNCHEZ-CAMPILLO, M.; BARRANCO, A.; RUEDA, R.; CHAN, J. P.; KUCHAN, M. J.; LARQUÉ, E. Calcifediol during pregnancy improves maternal and fetal availability of vitamin D compared to vitamin D3 in rats and modifies fetal metabolism. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.871632>. Acesso em: 22 maio 2025.

GEORGIEFF, Michael K.; RAMEL, Sara E.; CUSICK, Sarah E. Nutritional influences on brain development. **Acta paediatrica**, v. 107, n. 8, p. 1310-1321, 2018.

GHASEMI, A.; JEDDI, S.; KASHFI, K. The laboratory rat: Age and body weight matter. **EXCLI J** 20: 1431–1445 [em linha]. 2021.

GONÇALVES, Cinara L. et al. The many faces of microbiota-gut-brain axis in autism spectrum disorder. **Life sciences**, v. 337, p. 122357, 2024.

GREGORY, E.; PFAFF, D. W. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. **Physiology & Behavior**, v. 6, n. 5, p. 573–576, 1971.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical**

Biochemistry, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

GUERINI, F. R. et al. Vitamin D Receptor Polymorphisms Associated with Autism Spectrum Disorder. **Autism Research**, 13: 680-690, 2020.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HANSEN, S. N; SCHENDEL, D. E; PARTNER, E. T. Explaining the increase in the prevalence of Autism Spectrum Disorders: The proportion attributable to changes in reporting practices. **JAMA Pediatr.**,169:56–62, 2015.

HARATIZADEH, Sara et al. An overview of modeling and behavioral assessment of autism in the rodent. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 81, n. 3, p. 221-228, 2021.

HSIEH, Chiu-Lan et al. Multiple point action mechanism of valproic acid-teratogenicity alleviated by folic acid, vitamin C, and N-acetylcysteine in chicken embryo model. **Toxicology**, v. 291, n. 1-3, p. 32-42, 2012.

HOSSEIN-NEZHAD, Arash; HOLICK, Michael F. Vitamin D for health: a global perspective. In: **Mayo clinic proceedings**. Elsevier, 2013. p. 720-755.

HOWLIN, P.; MAGIATI, I. Autism spectrum disorder: outcomes in adulthood. **Current Opinion In Psychiatry**, v. 30, p. 69–76, 2017.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - Censo Demográfico 2022 Pessoas com deficiência e pessoas diagnosticadas com transtorno do espectro autista Resultados preliminares da amostra. 2025.

INNIS, Sheila M. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. **Brain research**, v. 1237, p. 35-43, 2008.

ITO, Masanobu et al. The long-term prognosis of hippocampal neurogenesis and

behavioral changes of offspring from rats exposed to valproic acid during pregnancy. **Neuropsychopharmacology Reports**, v. 41, n. 2, p. 260-264, 2021.

JABER, Mohamed. Genetic and environmental mouse models of autism reproduce the spectrum of the disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 130, n. 3, p. 425-432, 2023.

JACKSON, Corey et al. Maternal consumption of a diet lacking omega-3 fatty acids during development alters pup behavior and brain metabolism later in life. **The FASEB Journal**, v. 30, p. 915.3-915.3, 2016.

JAISWAL, A. K. Neurobehavioural effects of prenatal sodium valproate exposure in rat offspring. **Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 127–133, 2016. DOI: 10.5958/2321-5836.2016.00024.0.

JAMES, S. et al. Omega-3 fatty acids supplementation for autism spectrum disorders (ASD) (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews Omega-3**, n. 11, 2011.

JAUREGUIBERRY, M. S.; VENTURINO, A. Nutritional and environmental contributions to autism spectrum disorders: Focus on nutrigenomics as complementary therapy. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 92, n. 3–4, p. 248–266, 2022.

JETTER, Alexander et al. Pharmacokinetics of oral vitamin D3 and calcifediol. **Bone**, v. 59, p. 14-19, 2014.

JONES, S. C. et al. Autism in Australia: community knowledge and autistic people's experiences. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 51, p. 3677–3689, 2021.

KAIDANOVICH-BEILIN, Oksana et al. Assessment of social interaction behaviors. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 48, p. 2473, 2011.

KANNER, Leo et al. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous child**, v. 2, n.

3, p. 217-250, 1943.

KARHU, E. et al. Nutritional interventions for autism spectrum disorder. **Nutrition Reviews**, v. 78, n. 7, p. 515–531, 2020.

KAVIANI, Mina et al. Effects of vitamin D supplementation on depression and some involved neurotransmitters. **Journal of affective disorders**, v. 269, p. 28-35, 2020.

LAI, Meng-Chuan et al. Biological sex affects the neurobiology of autism. **Brain**, v. 136, n. 9, p. 2799-2815, 2013.

LAING, B.; FERGUSON, L. R. Genetic variations in Vitamin D metabolism genes and the microbiome, in the presence of adverse environmental changes, increase immune dysregulation. [**S.I.:** **s.n.**], 2015.

LANGGUTH, M. et al. No effect of prenatal vitamin D deficiency on autism-relevant behaviours in multiple inbred strains of mice. **Behavioural Brain Research**, v. 248, p. 42-52, 2018.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992.

LI, Bingbing et al. The effect of vitamin D supplementation in treatment of children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutritional neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 835-845, 2022.

LI, Z. et al. Global, regional, and national burden of autism spectrum disorder from 1990 to 2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, v. 31, e33, 2022.

LIN, Jaime et al. Risk factors and clinical profile of autism spectrum disorder in southern Brazil. **Journal of Psychiatric Research**, v. 169, p. 105-112, 2024.

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

LORD, C. et al. Autism spectrum disorder. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 6, n. 5, 2020.

MABUNGA, Darine Froy N. et al. Exploring the validity of valproic acid animal model of autism. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 285, 2015.

MAENNER, M. J. et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years — autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2016. **Surveillance Summaries**, v. 69, n. 4, p. 1-12, 2020.

MAISLOS, Maximo; SILVER, Justin; FAINARU, Menahem. Intestinal absorption of vitamin D sterols: differential absorption into lymph and portal blood in the rat. **Gastroenterology**, v. 80, n. 6, p. 1528-1534, 1981.

MANSON, JoAnn E. et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 1, p. 33-44, 2019.

MARTINAT, Maud et al. Perinatal dietary polyunsaturated fatty acids in brain development, role in neurodevelopmental disorders. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1185, 2021.

MARTINS, B. P.; BANDARRA, N. M.; FIGUEIREDO-BRAGA, M. The role of marine omega-3 in human neurodevelopment, including Autism Spectrum Disorders and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder—a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 9, p. 1431–1446, 2020.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, Iwona; WITKOWSKA, Anna Maria; ZUJKO, Małgorzata Elżbieta. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.

MODABBERNIA, A.; VELTHORST, E.; REICHENBERG, A. Environmental risk factors

for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. **Molecular Autism**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2017.

MOLDRICH, Randal X. et al. Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. **Behavioural brain research**, v. 257, p. 253-264, 2013.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006.

MOY, S. S., et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes, Brain and Behavior**, 3(5), 287–302, 2004.

NAKASATO, Akane et al. Swim stress exaggerates the hyperactive mesocortical dopamine system in a rodent model of autism. **Brain research**, v. 1193, p. 128-135, 2008.

NEVINS, Julie EH et al. Omega-3 fatty acid dietary supplements consumed during pregnancy and lactation and child neurodevelopment: a systematic review. **The Journal of nutrition**, v. 151, n. 11, p. 3483-3494, 2021.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 217-227, 2018.

NOLAN, Suzanne O. et al. Prenatal high-fat diet rescues communication deficits in Fmr1 mutant mice in a sex-specific manner. **Developmental neuroscience**, v. 42, n. 2-4, p. 94-104, 2021.

NOLAN, Suzanne O. et al. Dietary rescue of adult behavioral deficits in the Fmr1 knockout mouse. **Plos one**, v. 17, n. 1, p. e0262916, 2022.

OGBU, Destiny; XIA, Eric; SUN, Jun. Gut instincts: vitamin D/vitamin D receptor and microbiome in neurodevelopment disorders. **Open Biology**, v. 10, n. 7, p. 200063,

2020.

OLEXOVÁ, Lucia et al. Habituation of exploratory behaviour in VPA rats: animal model of autism. **Interdisciplinary toxicology**, v. 6, n. 4, p. 222, 2013.

OMAROVA, Naira K.; SOLTAKHANOV, Eldar M.; OMAROVA, Patimat A. Genetic factors of vitamin D3 deficiency and their clinical significance. **Ecological Medicine**, v. 2, n. 1, p. 68-73, 2019.

OSTROWSKI, Janusz et al. Autism spectrum disorders: etiology, epidemiology, and challenges for public health. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 30, p. e944161-1, 2024.

OVEREEM, Kathie et al. The impact of vitamin D deficiency on behaviour and brain function in rodents. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 7, p. 47-52, 2016.

PAN, Pauline et al. The effects of vitamin D3 during pregnancy and lactation on offspring physiology and behavior in Sprague–Dawley rats. **Developmental psychobiology**, v. 56, n. 1, p. 12-22, 2014.

PANGRAZZI, Luca; BALASCO, Luigi; BOZZI, Yuri. Oxidative stress and immune system dysfunction in autism spectrum disorders. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3293, 2020.

PELLICANO, E.; DEN HOUTING, J. Annual research review: shifting from 'normal science' to neurodiversity in autism science. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 63, p. 381-396, 2022.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.

PELLOW, S. et al. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167,

1985.

PIRI, Fatemeh; SALMANI, Mahmoud Elahdadi; SEPEHRI, Hamid. Improvement of autistic-like behaviors in adult rats prenatally exposed to valproic acid through early suppression of orexin receptor. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 86, n. 1, p. 166-171, 2024.

PODGORAC, Jelena et al. The influence of continuous prenatal exposure to valproic acid on physical, nociceptive, emotional and psychomotor responses during adolescence in mice: Dose-related effects within sexes. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 16, p. 982811, 2022.

PLUDOWSKI, Pawel et al. Vitamin D supplementation guidelines. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 175, p. 125-135, 2018.

POSAR, A.; VISCONTI, P. Autismo em 2016: necessidade de respostas. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 2, p. 111–119, 2017.

PRIETL, Barbara et al. Vitamin D and immune function. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2502-2521, 2013.

PROVVEDINI, Diego M. et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. **Science**, v. 221, n. 4616, p. 1181-1183, 1983.

PRUT, L.; BELZUNG, C.; The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol.**, Feb 28;463(1-3):3-33, 2003.

QUESADA-GOMEZ, J. M.; BOUILLON, R. Is calcifediol better than cholecalciferol for vitamin D supplementation?. **Osteoporosis International**, v. 29, p. 1697-1711, 2018.

ROGGE, Nicky; JANSSEN, Juliette. The economic costs of autism spectrum disorder: A literature review. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 49, n. 7, p. 2873-2900, 2019.

ROMOLI, Michele et al. Valproic acid and epilepsy: from molecular mechanisms to clinical evidences. **Current neuropharmacology**, v. 17, n. 10, p. 926-946, 2019.

ROYER, P. Metabolism and action of vitamin D in the fetus. **Acta Paediatrica Hungarica**, v. 25, p. 161-163, 1984. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6477766>. Acesso em: 22 maio 2025.

RUHELA, R. K.; SONI, S.; SARMA, P.; PRAKASH, A.; MEDHI, B. Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. **Annals of Neurosciences**, v. 26, n. 1, p. 25-31, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5214/ANS.0972.7531.260106>. Acesso em: 22 maio 2025.

SALIH, Y. Z.; AHMED, F. A. Neurobehavioral biochemical changes associated with acute administration of omega-3 in male rats. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 26, p. 83-89, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.33899/IJVS.2020.166878>. Acesso em: 22 maio 2025.

SANTOS, M.; DA SILVA, T. C. B.; DA SILVA, F. B. O.; SIEBERT, C.; KROTH, A.; SANTOS DA SILVEIRA, E. M.; WYSE, Â. T. S.; PARTATA, W. A. Effects of vitamin D administration on nociception and spinal cord pro-oxidant and antioxidant markers in a rat model of neuropathic pain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1414-431X2021e11207>. Acesso em: 22 maio 2025.

SAKADE, Y. et al. Exposure to valproic acid during middle to late-stage corticogenesis induces learning and social behavioral abnormalities with attention deficit/hyperactivity in adult mice. **Biomedical Research-Tokyo**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 179–188, 2019. DOI: 10.2220/BIOMEDRES.40.179.

SASS, Laerke et al. High-dose vitamin D supplementation in pregnancy and neurodevelopment in childhood: a prespecified secondary analysis of a randomized clinical trial. **JAMA network open**, v. 3, n. 12, p. e2026018-e2026018, 2020.

SAÚDE, Ministério da. **TEA: saiba o que é o Transtorno do Espectro Autista e**

como o SUS tem dado assistência a pacientes e familiares, 2022.

SCHAEFER, G. B; MENDELSON, N. J. Professional practice and guidelines committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of Autism Spectrum Disorders. **Genet. Med.**, v.10:301–305, 2008.

SCHAVINSKI, Aline Z. et al. Maternal Vitamin D Deficiency Impairs the Development of β Cells in Offspring Rats in a Sex-Dependent Manner. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 8, p. 4136, 2024.

SCHIAVI, Sara et al. Perinatal supplementation with omega-3 fatty acids corrects the aberrant social and cognitive traits observed in a genetic model of autism based on FMR1 deletion in rats. **Nutritional neuroscience**, v. 25, n. 5, p. 898-911, 2022.

SCHMIDT, C. Transtorno do espectro autista: onde estamos e para onde vamos. **Psicologia em Estudo**, v. 22, n. 2, p. 221-230, 2017.

SCHMIDT, Rebecca J. et al. Neonatal vitamin D status in relation to autism spectrum disorder and developmental delay in the CHARGE case–control study. **Autism Research**, v. 12, n. 6, p. 976-988, 2019.

SCHNEIDER, T.; PRZEWLOCKI, R. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.

SCHWINGEL, Gustavo Brum et al. Preventive effects of resveratrol against early-life impairments in the animal model of autism induced by valproic acid. **IBRO Neuroscience Reports**, v. 15, p. 242-251, 2023.

SHAW, K. A. et al. Prevalência e identificação precoce do transtorno do espectro autista entre crianças de 4 e 8 anos — Rede de Monitoramento do Autismo e Deficiências do Desenvolvimento, 16 locais, Estados Unidos, 2022. **MMWR Surveillance Summaries**, 74(SS-2), 1–22, 2025.

SHEN, Yingying et al. Bibliometric study of neuroinflammation in autism spectrum disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 14, p. 1086068, 2023.

SIAFIS, S. et al. Pharmacological and dietary-supplement treatments for autism spectrum disorder: a systematic review and network meta-analysis. **Molecular Autism**, v. 13, n. 1, p. 10, 2022.

SILVA, A. F. C. et al. A relação do déficit de vitamina D e o transtorno do espectro autismo. **Journal of Business and Management**, v. 23, n. 2, p. 9-17, 2021.

SIRACUSANO, M. et al. Vitamin D deficiency and autism spectrum disorder. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 21, p. 2460-2474, 2020.

SITAR, Mustafa Erinc et al. Experimental Vitamin D Deficiency in Rats: Clinical Chemistry, Histopathological, and Immunological Evaluation. **Cureus**, v. 16, n. 8, 2024.

SMITH, Bobbie et al. The relationship between sensory sensitivity, food fussiness and food preferences in children with neurodevelopmental disorders. **Appetite**, v. 150, p. 104643, 2020.

SÖĞÜT, Sadık et al. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. **Clinica Chimica Acta**, v. 331, n. 1-2, p. 111-117, 2003.

SULIMAN, Mahmoud; SCHMIDTKE, Michael W.; GREENBERG, Miriam L. The role of the UPR pathway in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 15, p. 735622, 2021.

SYDNOR, Lindsey M.; ALDINGER, Kimberly A. Structure, function, and genetics of the cerebellum in autism. **Journal of psychiatry and brain science**, v. 7, p. e220008, 2022.

TAKAHASHI, Katsushi et al. Human neutrophils express messenger RNA of vitamin

D receptor and respond to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 335-347, 2002.

TAMANG, Man Kumar et al. Developmental vitamin D-deficiency produces autism-relevant behaviours and gut-health associated alterations in a rat model. **Translational Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 204, 2023.

TAMAOKI, Yuko et al. Degraded inferior colliculus responses to complex sounds in prenatally exposed VPA rats. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 16, n. 1, p. 2, 2024.

TAN, M. L.; HO, J. J.; THE, K. H. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for children with specific learning disorders. **Cochrane Database Syst Rev**. 2012.

TRIFONOVA, E. A. et al. The mTOR signaling pathway activity and vitamin D availability control the expression of most autism predisposition genes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 6332, 2019.

TRIVEDI, Mahendra Kumar et al. supplementation improves spatial memory, muscle function, pain score, and modulates different functional physiological biomarkers in vitamin D. 2023.

TURPIN, Valentine et al. Mice prenatally exposed to valproic acid do not show autism-related disorders when fed with polyunsaturated fatty acid-enriched diets. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 11235, 2023.

UKEZONO, Masatoshi et al. Impairments of social interaction in a valproic acid model in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 18, p. 1430267, 2024.

VESELINOVIĆ, A. et al. Neuroinflammation in autism and supplementation based on omega-3 polyunsaturated fatty acids: a narrative review. **Medicina (Kaunas)**, v. 57, n. 9, p. 893, 2021.

VYAS, Chirag M. et al. Relation of serum BDNF to major depression and exploration

of mechanistic roles of serum BDNF in a study of vitamin D3 and omega-3 supplements for late-life depression prevention. **Journal of psychiatric research**, v. 163, p. 357-364, 2023.

VINKHUYZEN, A. A. et al. Gestational vitamin D deficiency and autism spectrum disorder. **The British Journal of Psychiatry**, v. 3, p. 85-90, 2017.

VORHEES, C. V. Teratogenicity and developmental toxicity of valproic acid in rats. **Teratology**, v. 35, n. 2, p. 195-202, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tera.1420350205>. Acesso em: 22 maio 2025.

WANG, Zuqun; DING, Rui; WANG, Juan. The association between vitamin D status and autism spectrum disorder (ASD): a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 86, 2020.

WINDHAM, G. C. et al. níveis maternos de vitamina D durante a gravidez em associação com transtornos do espectro do autismo (TEA) ou deficiência intelectual (DI) na prole; Explorando padrões não lineares e subgrupos demográficos. **Autismo Res.** Dezembro; 13(12):2216-2229, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **ICD-11 for mortality and morbidity statistics. Version: 2022 February**. Geneva: WHO; 2022. Acesso em: 24 abr. 2022. Disponível em: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fid%2fentity%2f437815624>

WONG, Sarah; GIULIVI, Cecilia. Autism, mitochondria and polybrominated diphenyl ether exposure. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets-CNS & Neurological Disorders**, v. 15, n. 5, p. 614-623, 2016.

WU, Dong-Mei et al. Relationship between neonatal vitamin D at birth and risk of autism spectrum disorders: the NBSIB study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 3, p. 458-466, 2018.

WULTZ, B. et al. The spontaneously hypertensive rat as an animal model of

attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior. **Behavioral and Neural Biology**, v. 53, n. 1, p. 88–102, 1990.

XU, Zejun et al. Valproate decreases vitamin D levels in pediatric patients with epilepsy. **Seizure**, v. 71, p. 60-65, 2019.

XU, Xinxin et al. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation alleviates abnormal behavior in valproic acid rat model of autism through rescuing synaptic plasticity and inhibiting neuroinflammation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 240, p. 173788, 2024.

YADAV, S. et al. Comparative efficacy of alpha-linolenic acid and gamma-linolenic acid to attenuate valproic acid-induced autism-like features. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 187-198, 2017.

YATES, N. J. et al. Vitamin D is crucial for maternal care and offspring social behaviour in rats. **Journal of Endocrinology**, v. 237, n. 2, p. 73-85, 2018.

YENKOYAN, K. et al. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 331, p. 92-101, 2017.

YOCHUM, Carrie L. et al. VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. **Brain research**, v. 1203, p. 126-132, 2008.

YORBIK, O. et al. Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 67, n. 5, p. 341-343, 2002.

YULE, Summer et al. Nutritional deficiency disease secondary to ARFID symptoms associated with autism and the broad autism phenotype: a qualitative systematic review of case reports and case series. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 121, n. 3, p. 467-492, 2021.

ZABLOTSKY, B. et al. Prevalence and trends of developmental disabilities among

children in the United States: 2009–2017. **Pediatrics**, v. 144, e20190811, 2019.

ZAHEDI, Elham et al. Valproate-induced murine autism spectrum disorder is associated with dysfunction of amygdala parvalbumin interneurons and downregulation of AMPK/SIRT1/PGC1 α signaling. *Metabolic Brain Disease*, v. 38, n. 6, p. 2093-2103, 2023.

ZARATE-LOPEZ, David et al. Three decades of valproate: a current model for studying autism spectrum disorder. **Current neuropharmacology**, v. 22, n. 2, p. 260-289, 2024.

ZEESTRATEN, E. A. et al. Sex differences in frontal lobe connectivity in adults with autism spectrum conditions. **Translational psychiatry**, v. 7, n. 4, p. e1090-e1090, 2017.

ZEIDAN, Jinan et al. Global prevalence of autism: A systematic review update. **Autism research**, v. 15, n. 5, p. 778-790, 2022.

ZHANG, Yong et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 5, p. 2127-2135, 2012.

ANEXO A – CERTIFICADO APROVAÇÃO CEUA/UNESC



**Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais**



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **26/07/2022**.

Título do projeto	Análise do efeito combinado do uso de vitamina D na gestação e do ômega 3 na prole em um modelo experimental de transtorno do espectro autista .
Project title	<i>Analysis of the combined effect of vitamin D in pregnancy and omega 3 use in offspring in an experimental model of autism spectrum disorder.</i>
Número do protocolo Protocol number	35/2022 adendo
Pesquisador principal Principal Investigator	Cinara Ludvig Gonçalves
Pesquisadores Researchers	Beatriz Galatto Nesi, Bruna de Andrade Flauzino, Bruna Bittencourt Netto, Caroline Pacheco Rodrigues, Eduarda Mussoi Flor, Flávia da Silva Daros, Gláucia Crispim da Silva, Gustavo Zanette Fernandes, Jaime Lin, João Victor Folle, José Marcelo Botacin Campos, Maiara de Aguiar da Costa, Maria Carolina Marciano Campos de Souza, Maria Goreti Aléssio Crispim, Mariana Setubal Milverstet, Mariane Gomes Machado, Rosiane Ronchi Nascimento Costa, Simone Lespinasse Araujo, Sofia Januário Bolan, Thais Marson Meneguzzo, Victória Linden de Rezende, Vitória Zaccaron Danielski, William dos Santos Horacio, William Tassi Moreira.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/06/2022 a 20/06/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / <i>Wistar</i>
Idade/Peso	60 dias / 250-300g
Número de animais	Feminino 39 e Masculino 20 = 59
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / <i>Wistar</i>
Idade/Peso	1 dia / 30g
Número de animais	Feminino 96 e Masculino 96 = 196
Total	251
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net

Josiane Budni
 Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 26 de julho de 2022