

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

**THAYNA PATACHINI MAIA BECKER**

**EFEITOS ANTIOXIDANTE E COMPORTAMENTAL DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DE UVAS ROXAS ORGÂNICAS E NÃO ORGÂNICAS EM UM  
MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPROICO**

ANTIOXIDANT AND BEHAVIORAL EFFECTS OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT  
OF ORGANIC AND NON-ORGANIC PURPLE GRAPES IN AN ANIMAL MODEL OF  
AUTISM INDUCED BY VALPROIC ACID

EFFECTOS ANTIOXIDANTES Y CONDUCTUAL DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE UVAS MORADAS ORGÁNICAS Y NO ORGÁNICAS EN  
UN MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUCIDO POR ÁCIDO VALPROICO

JOINVILLE – SC

2024

THAYNA PATACHINI MAIA BECKER

**EFEITOS ANTIOXIDANTE E COMPORTAMENTAL DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DE UVAS ROXAS ORGÂNICAS E NÃO ORGÂNICAS EM UM  
MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPROICO**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE como requisito de título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela Delwing de Lima.

JOINVILLE - SC

2024

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

B396e Becker, Thayna Patachini Maia  
Efeitos antioxidante e comportamental do extrato hidroalcoólico de uvas roxas orgânicas e não orgânicas em um modelo animal de autismo induzido por ácido valproico / Thayna Patachini Maia Becker; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima. – Joinville: UNIVILLE, 2024.

108 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Transtornos do espectro autista. 2. Uva – Uso terapêutico. 3. Animais de laboratório. 4. Estresse oxidativo. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Título.

CDD 616.8982

Elaborada por Ana Paula Blaskovski Kuchnir – CRB-14/1401

**Termo de Aprovação**

**“Efeitos Antioxidante e Comportamental do Extrato Hidroalcoólico de Uvas Roxas Orgânicas e não Orgânicas em um Modelo Animal de Autismo Induzido por Ácido Valproico”**

por

Thayná Patachini Maia

**Banca Examinadora:**

Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima  
Orientadora (UNIVILLE)

Profa. Dra. Larissa Delmonego  
(ANHANGUERA)

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger  
(UNIVILLE)

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima  
Orientadora (UNIVILLE)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luciano Lorenzi  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 27 de junho de 2024

*“Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, minha família, meu marido, meus colegas de trabalho e mestrado, minha orientadora e colegas de pesquisa pela constante ajuda, compreensão, incentivo e amor nessa jornada.”*

## **AGRADECIMENTOS**

Início meus agradecimentos com uma frase que me marcou durante toda a vida: "Tudo posso naquele que me Fortalece". À Deus, pois todo e qualquer esforço sempre será primeiramente à Ele o meu maior agradecimento, pelo dom da vida, e por cada passo a seguir nessa jornada.

Ao meu marido, Johnny Becker, que nesses últimos dois anos não foi só essencial em me ajudar, auxiliar e me incentivar em todas as minhas decisões, como também participar nesse trabalho juntamente com os demais pesquisadores, me auxiliando e muitas vezes se sobrecarregando na ajuda de mostrar um trabalho efetivo, sem ele esse resultado não seria possível.

A minha orientadora e amiga Daniela Delwing de Lima, que nesses últimos 10 anos esteve presente ao meu lado, me incentivando como pesquisadora durante a faculdade inteira de medicina e ainda agora após dela, e sendo além de uma orientadora, alguém essencial para realização de cada etapa, não tenho palavras para agradecer a uma pessoa tão incrível, cuidadosa nos mínimos detalhes e acima de tudo um anjo da guarda na vida de quem a conhece. Sem dúvidas, a melhor pessoa em quem eu pudesse me espelhar pelo profissionalismo e competência impecável.

Aos meus pais, que sempre estiveram do meu lado, não medindo esforços para me tornar melhor a cada dia, meu profundo agradecimento e amor por tudo que já fizeram que ainda fazem por mim.

Aos pesquisadores Klaus, Natalia, Alessandra e todo o grupo de pesquisa MSD da Univille, meu muitíssimo obrigado por todo o tempo de dedicação, pela ajuda essencial, sem a contribuição de todos vocês este trabalho não teria se findado.

A todos os professores do mestrado pelos ensinamentos, e a todos aqueles que de alguma forma estiveram ao meu lado durante a execução deste trabalho.

Aos membros da banca, pelas riquíssimas contribuições e o desprendimento de tempo em ler e ajudar na melhora deste trabalho.

À UNIVILLE, CAPES e a FURB.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

*“Tudo posso naquEle que me fortalece”.*

**Filipenses 4:13**

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

**Isaac Newton**

## RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio do neurodesenvolvimento, caracterizado por deficiências na comunicação social, interesses restritos e comportamentos repetitivos. Estudos destacam a influência de fatores genéticos e ambientais na etiologia do TEA, bem como a possível ligação com exposição pré-natal a substâncias agrotóxicas. O Ácido Valproico (AVP) é um fármaco anticonvulsivante e estabilizador de humor que tem ligação com o TEA, demonstrada na exposição pré-natal em modelo animal. Além disso, a deficiência nutricional devido a seletividade alimentar é comum em pacientes com TEA, o que propõe o uso de suplementos vitamínicos. Compostos polifenólicos, encontrados em frutos de *Vitis labrusca*, como, por exemplo, em uvas e vinho tinto, tem potencial neuroprotetor. Objetivos: Verificar os efeitos protetores do extrato hidroalcoólico (EHA) de uvas roxas orgânicas e não orgânicas sobre a modulação do comportamento e sobre parâmetros de estresse oxidativo em sangue, córtex cerebral e cerebelo de ratos machos Wistar (35 dias) com comportamento autista. Metodologia: O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIVILLE (CEUA 02/2022). As fêmeas gestoras receberam 800mg/kg de AVP através de administração intraperitoneal, em uma única vez no 12 dia gestacional. A prole foi submetida a testes comportamentais e de comportamento repetitivo para verificar a resposta motora e psicoterápica dos roedores ao autismo. Após os testes, foi realizado o tratamento com EHA preparado a partir de frutos de *Vitis labrusca* roxa orgânica e não orgânica. O estudo envolveu grupos de animais que receberam as concentrações *Vitis labrusca Vitis labrusca* diárias de EHA de uva orgânica e não orgânica (EHA-I) de 30mg/kg (EHA ou EHA-I 30), 100mg/kg (EHA ou EHA-I 100) e 150mg/kg (EHA ou EHA-I 150) e controle com salina por 15 dias. Os animais foram posteriormente sacrificados por decapitação para análise do estado redox em sangue, córtex cerebral e cerebelo através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), do conteúdo total de sulfidrilas e de carbonilas, e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Duncan e teste de Kruskal Wallis, quando indicado ( $p < 0,05$ ). Em relação aos resultados, os testes comportamentais mostraram estereotipia no grupo autista no teste de auto limpeza, e o EHA e o EHA-I 150mg/kg diminuiu o tempo de movimentação, reduzindo o comportamento repetitivo. No teste de interação social, o

tempo de interação com o animal foi menor no grupo autista. Na avaliação do tempo de interação com o objeto, o grupo autista apresentou um maior tempo com o objeto do que o grupo controle. O EHA e o EHA-I em todas as concentrações (30 - 150mg/kg) conseguiram reverter esse tempo quando comparado ao grupo controle. No teste do campo aberto, o tempo de locomoção total durante o período analisado foi menor no grupo autista, sendo a baixa atividade locomotora um indicador de ansiedade no autismo. Na administração tanto do EHA quanto do EHA-I, na concentração de 150mg/kg, houve uma tendência a um tempo sem locomoção menor que no grupo autista. No teste de escavação, o grupo autista permaneceu com menor tempo de locomoção e de escavação e, o EHA 150mg/kg demonstrou uma reversão total e o EHA-I em todas as concentrações reverteu parcialmente esse parâmetro. No teste de olfato, a substância não social (extrato de baunilha) obteve um desinteresse maior pelo grupo autista e o EHA 150mg/kg aumentou o tempo de interesse por esse mesmo extrato. Em relação ao estresse oxidativo, o modelo animal de autismo aumentou TBA-RS e a atividade da SOD e diminuiu a atividade da CAT e da GSH-Px em sangue e aumentou TBA-RS e carbonilas e diminuiu a atividade da SOD em córtex cerebral, e em cerebelo diminuiu a atividade da GSH-Px. O EHA e o EHA-I foram capazes de reverter as alterações do TEA nos parâmetros de estresse oxidativo em cérebro e sangue de ratos. Diante disso, esse estudo mostrou que ocorreram alterações no comportamento de animais induzidos ao TEA, mostrando que tanto o EHA quanto o EHA-I foram capazes de prevenir a estereotipia observada e que o TEA gerou estresse oxidativo sanguíneo e cerebral e o EHA e EHA-I de uvas roxas orgânicas e não orgânicas reverteram esse quadro devido à capacidade antioxidante apresentada.

**Palavras Chave:** TEA, Modelo animal, *Vitis labrusca*, Testes comportamentais, Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by deficiencies in social communication, restricted interests and repetitive behaviors. Studies highlight the influence of genetic and environmental factors on the etiology of ASD, as well as the possible link with prenatal exposure to pesticides. Valproic acid (AVP) is an anticonvulsant and mood stabilizing drug that has a link with ASD, demonstrated in prenatal exposure in an animal model. Furthermore, nutritional deficiency due to food selectivity is common in patients with ASD, which suggests the use of vitamin supplements. Polyphenolic compounds, found in *Vitis labrusca* fruits, such as grapes and red wine, have neuroprotective potential. Objectives: To verify the protective effects of hydroalcoholic extract (EHA) of organic and non-organic purple grapes on the modulation of behavior and oxidative stress parameters in blood, cerebral cortex and cerebellum of male Wistar rats (35 days) with autistic behavior. Methodology: The project was approved by the UNIVILLE Ethics Committee (CEUA 02/2022). The pregnant females received 800mg/kg of AVP through intraperitoneal administration, in a single dose on the 12th gestational day. The offspring were subjected to behavioral and repetitive behavior tests to verify the rodents' motor and psychotherapeutic response to autism. After the tests, treatment was carried out with EHA prepared from organic and non-organic purple *Vitis labrusca* fruits. The study involved groups of animals that received daily concentrations of organic and non-organic grape EHA (EHA-I) of 30mg/kg (EHA or EHA-I 30), 100mg/kg (EHA or EHA-I 100) and 150mg /kg (EHA or EHA-I 150) and control with saline for 15 days. The animals were subsequently sacrificed by decapitation to analyze the redox state in blood, cerebral cortex and cerebellum through the levels of substances reactive to thiobarbituric acid (TBA-RS), the total content of sulfhydryls and carbonyls, and the activity of superoxide antioxidant enzymes. dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px). Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's post hoc test and Kruskal Wallis test, when indicated ( $p < 0.05$ ). Regarding the results, behavioral tests showed stereotypy in the autistic group in the self-grooming test, and EHA and EHA-I 150mg/kg decreased movement time, reducing repetitive behavior. In the social interaction test, the interaction time with the animal was shorter in the autistic group. When evaluating interaction time with the object, the autistic group spent more time with the object than the control group. EHA and EHA-I

at all concentrations (30 - 150mg/kg) managed to reverse this time when compared to the control group. In the open field test, the total locomotion time during the analyzed period was shorter in the autistic group, with low locomotor activity being an indicator of anxiety in autism. When administering both EHA and EHA-I, at a concentration of 150mg/kg, there was a tendency for a time without locomotion to be shorter than in the autistic group. In the digging test, the autistic group remained with shorter locomotion and digging time and EHA 150mg/kg demonstrated a complete reversal and EHA-I at all concentrations partially reversed this parameter. In the smell test, the non-social substance (vanilla extract) resulted in greater disinterest in the autistic group and EHA 150mg/kg increased the time of interest in this same extract. Regarding oxidative stress, the animal model of autism increased TBA-RS and SOD activity and decreased CAT and GSH-Px activity in blood and increased TBA-RS and carbonyls and decreased SOD activity in cerebral cortex, and in the cerebellum, GSH-Px activity decreased. EHA and EHA-I were able to reverse TEA changes in oxidative stress parameters in the brain and blood of rats. Therefore, this study showed that there were changes in the behavior of animals induced by ASD, showing that both EHA and EHA-I were able to prevent the observed stereotypy and that ASD generated blood and brain oxidative stress and EHA and EHA-I of organic and non-organic purple grapes reversed this situation due to the antioxidant capacity presented.

**Keywords:** ASD, Animal model, *Vitis labrusca*, Behavioral tests, Oxidative stress

## ABSTRACTO

El trastorno del espectro autista (TEA) es un trastorno del neurodesarrollo caracterizado por deficiencias en la comunicación social, intereses restringidos y comportamientos repetitivos. Estudios destacan la influencia de factores genéticos y ambientales en la etiología del TEA, así como el posible vínculo con la exposición prenatal a pesticidas. El ácido valproico (AVP) es un fármaco anticonvulsivo y estabilizador del estado de ánimo que tiene un vínculo con el TEA, demostrado en la exposición prenatal en un modelo animal. Además, la deficiencia nutricional debido a la selectividad alimentaria es común en pacientes con TEA, lo que sugiere el uso de suplementos vitamínicos. Los compuestos polifenólicos, que se encuentran en los frutos de *Vitis labrusca*, como las uvas y el vino tinto, tienen potencial neuroprotector. Objetivos: Verificar los efectos protectores del extracto hidroalcohólico (EHA) de uvas moradas orgánicas y no orgánicas sobre la modulación del comportamiento y parámetros de estrés oxidativo en sangre, corteza cerebral y cerebelo de ratas Wistar macho (35 días) con conducta autista. Metodología: El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de UNIVILLE (CEUA 02/2022). Las hembras preñadas recibieron 800 mg/kg de AVP mediante administración intraperitoneal, en una dosis única el día 12 de gestación. Las crías fueron sometidas a pruebas de comportamiento y conducta repetitiva para verificar la respuesta motora y psicoterapéutica de los roedores al autismo. Tras las pruebas se realizó un tratamiento con EHA elaborado a partir de frutos orgánicos y no orgánicos de *Vitis labrusca* morada. El estudio incluyó grupos de animales que recibieron concentraciones diarias de EHA de uva orgánica y no orgánica (EHA-I) de 30 mg/kg (EHA o EHA-I 30), 100 mg/kg (EHA o EHA-I 100) y 150 mg/kg (EHA o EHA-I 150) y control con solución salina durante 15 días. Los animales fueron posteriormente sacrificados por decapitación para analizar el estado redox en sangre, corteza cerebral y cerebelo a través de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), el contenido total de sulfhidrilos y carbonilos y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido. dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Duncan y la prueba de Kruskal Wallis, cuando estuvo indicado ( $p < 0,05$ ). Respecto a los resultados, las pruebas de comportamiento mostraron estereotipia en el grupo autista en el test de autoacicalamiento, y EHA y EHA-I 150mg/kg disminuyeron el tiempo de movimiento, reduciendo la conducta

repetitiva. En la prueba de interacción social, el tiempo de interacción con el animal fue más corto en el grupo autista. Al evaluar el tiempo de interacción con el objeto, el grupo autista pasó más tiempo con el objeto que el grupo de control. EHA y EHA-I en todas las concentraciones (30 - 150 mg/kg) lograron revertir este tiempo en comparación con el grupo de control. En la prueba de campo abierto, el tiempo total de locomoción durante el período analizado fue menor en el grupo autista, siendo la baja actividad locomotora un indicador de ansiedad en el autismo. Al administrar tanto EHA como EHA-I, a una concentración de 150 mg/kg, hubo una tendencia a que el tiempo sin locomoción fuera más corto que en el grupo autista. En la prueba de excavación, el grupo autista permaneció con una locomoción y un tiempo de excavación más cortos y EHA 150 mg/kg demostró una reversión completa y EHA-I en todas las concentraciones revirtió parcialmente este parámetro. En la prueba del olfato, la sustancia no social (extracto de vainilla) resultó en mayor desinterés en el grupo autista y EHA 150mg/kg aumentó el tiempo de interés en este mismo extracto. Respecto al estrés oxidativo, el modelo animal de autismo aumentó la actividad de TBA-RS y SOD y disminuyó la actividad de CAT y GSH-Px en sangre y aumentó la actividad de TBA-RS y carbonilos y disminuyó la actividad de SOD en la corteza cerebral, y en el cerebelo disminuyó la actividad de GSH-Px. EHA y EHA-I pudieron revertir los cambios de TEA en los parámetros de estrés oxidativo en el cerebro y la sangre de ratas. Por tanto, este estudio demostró que existieron cambios en el comportamiento de los animales inducidos por el TEA, demostrando que tanto el EHA como el EHA-I fueron capaces de prevenir la estereotipia observada y que el TEA generó estrés oxidativo sanguíneo y cerebral y el EHA y EHA-I de uvas moradas orgánicas y no orgánicas revirtieron esta situación debido a la capacidad antioxidante presentada.

**Palabras clave:** TEA, Modelo animal, Vitis labrusca, Pruebas de comportamiento, Estrés oxidative

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reações de Lipoperoxidação .....	29
Figura 2 - Interação entre o Extrato Hidroalcoólico de <i>Vitis labrusca</i> (EHA), Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e algumas enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GSH-Px) em uma mitocôndria exposta a ação exógena de Ácido Valpróico .....	28
Figura 3 - Demonstração do protocolo experimental para posterior análise.....	41
Figura 4 - Teste de campo aberto realizado e adaptado conforme Hall em 1934.....	42
Figura 5 - Teste de 3 câmeras realizado e adaptado conforme Karvat e Kimchi, 2012.....	42
Figura 6 - Movimentação do animal no teste auto limpeza adaptado e seguindo Moretti <i>et al.</i> , 2013.....	43
Figura 7 - Teste de escavação realizado e seguindo Thomas <i>et al.</i> , 2009.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Administração de AVP para caracterização de modelos experimentais de autismo. Descrições baseadas em trabalhos publicados entre os anos 2008 e 2012.....	22
Tabela 2 - Divisão dos grupos para indução do autismo e tratamento com EHA de uvas orgânicas.....	40
Tabela 3 - Divisão dos grupos para indução do autismo e tratamento com EHA de uvas não orgânicas .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVP: Ácido Valproico  
EHA: Extrato hidroalcoólico  
EHA1: Extrato hidroalcoólico de uvas não orgânicas  
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio  
ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio  
GSH: Glutathione  
GSH-Px: Glutathione Peroxidase  
L·: Radical Lipídico  
LH: Ácido Graxo Poliinsaturado  
LOO·: Radical Peroxila  
LOOH: Hidroperóxidos  
MDA: Malondialdeído  
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato  
NAGS: N-acetil glutamato sintetase  
NO·: Óxido Nítrico  
NOS: Óxido Nítrico Sintase  
O<sub>2</sub>: Oxigênio  
O<sub>2</sub> ·-: Radical Superóxido  
OH·: Radical Hidroxil  
ONOO·: Ânion Peroxinitrito  
OTC: Ornitina Transcarbamilase  
RNA: Ácido Ribonucleico  
SOD: Superóxido Dismutase  
SOD-Cu-Zn: Superóxido Dismutase Cobre-Zinco  
SOD-Mn: Superóxido Dismutase Manganês  
TEA: Transtorno do Espectro Autista  
TCA: Teste de campo aberto  
TBA-RS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 REVISÃO</b> .....	<b>19</b>
3.1 DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO DO TEA .....	19
3.2 EPIDEMIOLOGIA .....	21
3.3 FATORES CAUSAIS .....	21
3.3.1 Genética/Hereditariedade: .....	22
3.3.2 Fatores ambientais .....	22
3.3.2.1 Idade parental avançada .....	22
3.3.2.2 Uso do ácido valpróico durante a gravidez .....	23
3.3.2.3 Estado nutricional materno .....	24
3.3.2.4 Exposição à agentes ambientais .....	25
3.4 FATORES PROTETIVOS .....	26
3.5 TRATAMENTO .....	26
3.5.1 Terapias comportamentais .....	26
3.5.2 Tratamentos dietéticos e Resveratrol .....	26
3.5.3 Tratamento medicamentoso .....	28
3.6 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	29
3.6.1 Radicais Livres .....	29
3.6.1 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação .....	30
3.6.2 Danos às proteínas .....	31
3.6.3 Danos ao DNA .....	31
3.6.2 Antioxidantes e estresse oxidativo .....	32
3.6.3 Autismo e estresse oxidativo .....	33
3.6.4 Autismo e antioxidantes .....	34

<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>36</b>
4.1 ANIMAIS.....	36
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	36
4.2.1 Obtenção do material vegetal .....	36
4.2.2 Preparação e obtenção do extrato bruto etanólico .....	36
4.2.3 Avaliação quantitativa dos metabólitos secundários .....	37
4.2.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	37
4.2.3.2 Determinação do teor de flavonoides totais .....	37
4.2.3.3 Determinação do conteúdo de flavonoides totais .....	37
4.2.3.4 Análise de compostos fenólicos nos extratos por HPLC-ESI-MS/MS.....	38
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	39
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	43
4.4.1 Teste de campo aberto (TCA).....	43
4.4.2 Teste de três câmaras para preferência e novidade social.....	44
4.4.3 Teste de auto limpeza repetitivo .....	45
4.4.4 Teste de escavação .....	46
4.4.5 Teste olfatório.....	46
4.5 ESTUDOS BIOQUÍMICOS.....	47
4.5.1 Preparação dos tecidos.....	47
4.5.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma .....	47
4.5.3 TBARS .....	48
4.5.4 Catalase (CAT).....	48
4.5.5 Glutathiona peroxidase (GSH-Px).....	48
4.5.6 Superóxido dismutase (SOD).....	49
4.5.7 Conteúdo Total de Sulfidrilas .....	49
4.5.8 Conteúdo Total de Carbonilas.....	50
4.5.9 Dosagem de proteínas .....	50
4.5.10 Análise Estatística .....	50
<b>5 INTERDISCIPLINARIDADE.....</b>	<b>51</b>

<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>52</b>
6.1 ARTIGO: Efeitos antioxidante e comportamental do extrato hidroalcoólico de uvas orgânicas e não orgânicas em um modelo animal de autismo induzido por ácido valproico .....	52
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>103</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno complexo do neurodesenvolvimento caracterizado por deficiências na comunicação social, interesses restritos e comportamentos repetitivos. Os indivíduos portadores de TEA frequentemente apresentam comorbidades associadas, principalmente em relação ao prejuízo em respostas emocionais e na empatia (Newschaffer *et al.*, 2007).

Estudos recentes apontam papel fundamental de fatores genéticos e ambientais na etiologia do TEA, e no neurodesenvolvimento de maneira mais ampla (Antonelli *et al.*, 2016; Hallmayer *et al.*, 2011). Outros trabalhos relatam, por exemplo, a ação de substâncias agrotóxicas que podem, direta ou indiretamente, alterar o neurodesenvolvimento durante períodos críticos de gestação e por isso estarem correlacionadas à etiologia do TEA (Braun *et al.*, 2014).

O Ácido Valpróico (AVP) é um fármaco anticonvulsivante e estabilizador do humor com utilizações em diversos transtornos neuropsicológicos, como, por exemplo, a epilepsia e o transtorno bipolar (Moore *et al.*, 2000; Dietert *et al.*, 2011; Rouillet *et al.*, 2013). A ligação entre o AVP e o TEA foi demonstrada em estudos epidemiológicos, inclusive na exposição pré-natal em modelo animal com ratos (Shah *et al.*, 2016).

Em relação ao tratamento farmacológico do TEA, para a agressividade e irritabilidade, os únicos medicamentos aprovados pelo FDA nos Estados Unidos são os antipsicóticos atípicos risperidona e aripiprazol, mostrando-se eficazes em ensaios clínicos randomizados controlados por placebo em sintomas específicos do TEA (Marcus *et al.*, 2009).

A deficiência nutricional nos pacientes com TEA é vista em decorrência da seletividade alimentar e consequentemente restrição de nutrientes essenciais para o desenvolvimento neurológico. Algumas revisões sistemáticas de 2017 a 2019 sugerem o uso de suplementos vitamínicos ou minerais e remoção de certos alimentos da dieta de uma criança com TEA. Níveis reduzidos de marcadores nutricionais, como, por exemplo, a metionina, homocisteína, cisteína e a glutatona total, devido a seletividade alimentar no TEA, que contribuem para uma adequada função celular e imunológica têm sido observadas em indivíduos com TEA (Main *et*

*al.*, 2010). Há alguns relatos de que essas dietas trazem diferença na maneira como pacientes com TEA interagem ou em como se sentem.

Os compostos polifenólicos presentes em uvas, amendoim e também no vinho tinto já foram relatados tendo um papel protetor e terapêutico em diversas patologias neurológicas, principalmente devido ao efeito neuroprotetor, antioxidante e anti-inflamatório (Berman *et al.*, 2017). Estudos envolvendo o resveratrol, assim como outros polifenóis presentes em muitas espécies de vegetais, demonstraram aumento da atividade antioxidante a nível cerebral em modelo animal, quando bebido em forma de vinho tinto, ao impulsionar as enzimas do metabolismo da glutatona (Mokni *et al.*, 2007; Martínez-Huélamo *et al.*, 2017). Também, o resveratrol possui atividade neuroprotetora sobre a regulação de enzimas antioxidantes (Tang, 2010; Andrade *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento com resveratrol em modelos de animais com TEA demonstrou-se preventivo em relação a sociabilidade e déficits sensoriais (Deckmann *et al.*, 2021).

Numerosos estudos indicam a presença de estresse oxidativo em indivíduos com TEA. A presença de radicais livres (RL) já foi encontrada na circulação sanguínea de pacientes autistas, podendo provocar desequilíbrio no processo fisiológico do organismo (Rose *et al.*, 2012).

A investigação de novos paradigmas em relação ao comportamento pró-social em modelos animais de TEA aumentou na última década. Essa investigação da expressão de comportamentos promove ações preventivas em relação às deficiências sociais dos pacientes. A implementação de diferentes nutrientes como, por exemplo, os frutos da videira e o resveratrol no cardápio alimentar do autista pode contribuir como estratégia na sua rotina alimentar, a fim de diminuir as carências nutricionais, e assim agir como suplemento nutricional na alimentação, e, ainda, contribuir para diminuição do estresse oxidativo, levando a prevenção de danos neurológicos e comportamentais de pacientes com TEA (Tang, 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar os efeitos antioxidantes e moduladores do comportamento do extrato hidroalcoólico (EHA) de uvas roxas orgânicas e não orgânicas em ratos submetidos à indução do TEA por ácido valproico e sua possível melhora na deficiência nutricional e na sintomatologia comportamental advinda do TEA.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Padronizar um protocolo experimental que simule a sintomatologia autista em roedores;
- 2) Obter o EHA de uvas roxas orgânicas e não orgânicas;
- 3) Verificar no EHA de uvas orgânicas e não orgânicas o teor de compostos fenólicos totais, conteúdo de flavonóis totais e analisar esses compostos;
- 4) Reproduzir o comportamento tipo autista induzido pelo ácido valproico através de testes comportamentais;
- 5) Mensurar parâmetros de estresse oxidativo através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas, conteúdo total de carbonilas e da atividade de enzimas antioxidantes: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) em sangue total, córtex cerebral e cerebelo de ratos que apresentam um comportamento tipo autista induzido por ácido valproico;
- 6) Verificar a possível redução do comportamento tipo autista em ratos tratados com o extrato hidroalcoólico de uva roxa orgânica (30, 100 e 150 mg/kg) e não orgânica (30, 100 e 150 mg/kg);
- 7) Verificar a influência da administração do EHA de uvas roxas orgânicas e não orgânicas (30, 100 e 150 mg/kg) sobre os efeitos causados pelo ácido valproico sobre os níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas, conteúdo total de carbonilas e atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GSH-Px e SOD) em sangue total, córtex cerebral e cerebelo de ratos.

### 3. REVISÃO

#### 3.1 Definição e diagnóstico do TEA

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma condição estabelecida pela dificuldade de desenvolvimento neurológico. Definida, segundo a Associação Americana de Psiquiatria (APA), principalmente pela presença de comportamentos restritos e repetitivos, concomitantes a déficits na comunicação e interação social (APA, 2014).

Segundo Rapin (2002), suas características clínicas e fenotípicas mais importantes, diretamente atreladas ao seu quadro fisiopatológico, são importantes déficits comportamentais e de comunicação social, comprometimento da linguagem ou incapacidade de falar, e forte tendência a padrões de comportamento estereotipados e repetitivos.

Comumente correlata ao TEA, a incapacidade intelectual é definida pela APA como deficiência nas habilidades mentais gerais e no funcionamento adaptativo. Além disso, portadores do TEA, costumeiramente apresentam outras características diretamente relacionadas ao quadro de deficiência do neurodesenvolvimento, como distúrbios gastrointestinais, epilepsia, distúrbios imunológicos e distúrbios do sono (insônia) (Almandil *et al.*, 2019).

Sinais e sintomas iniciais geralmente são manifestos na primeira infância, ou seja, no primeiro período do neurodesenvolvimento cognitivo; no entanto, déficits sociais e padrões comportamentais podem se tornar perceptíveis apenas quando as demandas sociais, educacionais e ocupacionais forem exigidas em fases mais avançadas do desenvolvimento neurocognitivo (APA, 2014).

Vale ressaltar que os sinais clínicos alterados, referentes ao neurodesenvolvimento, podem ser manifestos em diferentes graus de dificuldade, incluindo obstáculos presentes na interação social, comunicação verbal e não verbal, e comportamentos repetitivos. Em concordância à variação de estereótipos clínicos, tal diferença prejudica ainda mais o diagnóstico e estadiamento dessa condição clínica (Pieretti *et al.*, 1991).

Devido à heterogeneidade fenotípica e genotípica apresentada pelo TEA, sua abrangente diversidade entre severidade de sintomas e sinais, e seu

compartilhamento de manifestações com outras doenças neurológicas, os profissionais responsáveis por seu diagnóstico enfrentam diversas dificuldades ao longo do processo de análise dessa condição (Hayes *et al.*, 2018). E, embora a devastadora maioria de profissionais da saúde reconheça que o diagnóstico do TEA é permeado por diversos entraves e dificuldades, é possível a utilização de ferramentas que auxiliem nesse processo.

De maneira primária, o diagnóstico de autismo deve ser desenvolvido a partir de uma entrevista com os pais ou responsáveis pela criança, visando a coleta de informações que descrevam o comportamento perante a comunidade da qual a criança faz parte (Lai *et al.*, 2013) e sua capacidade cognitiva. Estudos como o de Lai *et al.*, (2013), salientam a importância do uso de ferramentas que permitam a padronização de ambas as entrevistas e conversas, como o Manual Diagnóstico de Transtornos Mentais (DSM-V), o manual de critérios diagnósticos mais utilizado na análise de um quadro suspeito de autismo. Da mesma forma, é possível a utilização de outro instrumento chamado Modified Checklist for Autism in Toddlers (MCAT), cujo principal objetivo é o rastreamento.

Não menos importante do que as ferramentas auxiliadoras do diagnóstico, mas de forma menos imediata, é de extrema necessidade a realização de um exame físico ministrado pelo médico, principalmente pela coexistência entre o autismo e síndromes específicas. Isso torna a realização do exame físico geral e neurológico tão relevante quanto a análise genética, como defendem os autores Almandil *et al.*, (2019) e Lai *et al.*, (2013).

Diante desse processo extenso e específico, o maior obstáculo é o tempo. Inclusive, segundo o estudo realizado por Matson *et al.*, (2014), diante da dificuldade enfrentada pelos profissionais de saúde para diagnosticar o autismo de maneira evidente e rápida, a grande maioria dos pais de crianças diagnosticadas com autismo demonstram completa insatisfação com o tempo levado para estabelecer o diagnóstico. Além disso, ao se tornarem, de forma inesperada, pais de um filho portador do TEA, alguns responsáveis se dizem ansiosos, desamparados e confusos.

### **3.2 Epidemiologia**

A incidência do TEA é de 4 a 5 vezes maior em meninos do que em meninas (Lyall *et al.*, 2017; APA, 2014). A história familiar positiva é um fator preponderante nas análises, visto que estudos apontam uma maior recorrência desse transtorno em familiares de crianças portadoras do espectro autista quando comparados com a população geral (Persico *et al.*, 2013).

Quanto aos dados brasileiros, estima-se que entre crianças de 0 e 4 anos, aproximadamente 115 mil poderiam ser diagnosticadas com TEA, de um total próximo de 16,5 milhões de crianças. Em 2010, por exemplo, a estimativa de casos de TEA girava em torno de 500 mil (Gomes *et al.*, 2015). Segundo a WHO, os dados estatísticos comprovaram que uma em cada 100 crianças têm TEA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

Em vista de sua apresentação clínica estar associada a outras comorbidades, o estudo realizado por Souza *et al.*, (2021), destacou a deficiência intelectual (entre 30 a 50% da população autista) e o transtorno mental (em cerca de 70% da população autista) como preponderantes na população com TEA. Quanto à epilepsia, uma comorbidade previamente conhecida por sua coexistência com o TEA, Jeste *et al.* (2015) ressaltam que sua prevalência é maior entre aqueles com deficiência intelectual.

Outras doenças, ainda não citadas, como transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), transtorno de ansiedade, depressão e transtorno bipolar, estão associados ao TEA em cerca de 79% dos casos (Howes *et al.*, 2017).

### **3.3 Fatores causais**

Muito se discute sobre as possíveis causas do TEA. Durante as últimas décadas, novos fatores causais foram descobertos, e com a ajuda da neurociência, mostra-se como agentes ambientais intervêm sobre o neurodesenvolvimento embrionário.

### 3.3.1 Genética/Hereditariedade:

Sabe-se que estudos recentes tiveram êxito ao confirmar a influência genética do autismo, sem a qual torna-se impossível o desenvolvimento da doença (Gialloreti *et al.*, 2019). Sua coexistência entre gêmeos homozigóticos é de 80% (Lai *et al.*, 2013), já em gêmeos heterozigóticos é de 0-24% (Almandil *et al.*, 2019).

Embora não exista um gene específico a ser relacionado como causa genética primária do autismo (Besag *et al.*, 2014), Taylor *et al.*, (2014) afirmam que existe uma recorrência de 7-20% em crianças que nasceram após um filho primogênito apresentar o TEA. Esse risco aumenta se o filho primogênito for do sexo masculino.

Porém, o fator genético por vezes pode ser insuficiente na evolução da doença. Surgem então questionamentos a respeito de quais seriam os fatores ambientais responsáveis por determinar multifatorialmente o desenvolver do TEA (Modabbernia *et al.*, 2017).

### 3.3.2 Fatores ambientais

#### 3.3.2.1 Idade parental avançada

Mais do que documentado e difundido, e assim como visto em outras síndromes de origem genética, a idade avançada dos pais é um fator de risco independente e significativo.

Durante o período de concepção, estudos como o de Taylor *et al.*, (2014), demonstram que a idade materna maior que 40 anos e paterna maior que 50 estão associados a maior incidência do TEA, assim como são maiores as chances de desenvolvimento quando ambos os pais apresentam idade avançada, em comparação a apenas um cônjuge com idade superior a 35 anos (SANDIN *et al.*, 2015). É confirmado também, um crescimento não-linear de casos de autismo em mães com mais de 29 anos (Idring *et al.*, 2014), apresentando um risco de 175 vezes a mais para mães entre 40-45 anos quando comparadas a mães de 29 anos ou menos. Por fim, um estudo de coorte, realizado por Sandin *et al.*, (2015) demonstrou que a ocorrência de autismo não está somente relacionada à idade avançada dos

pais, mas também aos mais jovens e de idades extremamente distintas entre si.

### 3.3.2.2 Uso do ácido valpróico durante a gravidez

O uso de farmacoterapêutica durante o período de concepção tem sido foco de novos estudos sobre as causas ambientais que podem promover o desenvolvimento de TEA. O AVP é um antiepiléptico utilizado amplamente no tratamento de transtornos neurológicos como, por exemplo, a epilepsia. No entanto, na gestação, o AVP quando utilizado no primeiro trimestre, possui ação teratogênica e já foi claramente demonstrado que pode estar associado a malformações neurológicas, aumentando também o fator de risco para o autismo de forma grave (Varghese *et al.*, 2017). Também, o AVP é um inibidor da histona deacetilase, podendo interromper a modulação da transcrição de genes, podendo, por essa via, induzir o TEA.

Atualmente, modelos de roedores baseados na exposição pré-natal são amplamente utilizados para estudar os mecanismos de causa, etiologia e danos neurológicos do TEA (Tabela 1). Desde 1996, estudos em animais, como ratos e camundongos, demonstraram que a exposição pré-natal ao AVP induz o comportamento do tipo autista (Rodier *et al.*, 1996). Também alterações anatômicas comuns em encéfalo foram encontradas, além dos animais do modelo desenvolverem padrões eletroencefalográficos anormais em resposta a estímulos auditivos (Nunes, 2015). Esse fator, assim como o estudo das estruturas cerebrais nos modelos animais, permite caracterizar as disfunções celulares e moleculares da patologia do autismo, sugerindo possíveis tratamentos (Cristensen *et al.*, 2013).

Tabela 1. Administração de AVP para caracterização de modelos experimentais de autismo. Descrições baseadas em trabalhos publicados entre os anos 2008 e 2012.

<b>Dose de administração do AVP</b>	<b>Principal efeito do AVP</b>	<b>Referência</b>
400 mg/kg	Aumento de células apoptóticas hipocámpais e cerebelares	Yochum <i>et al.</i> (2010)
	Padrões comportamentais anormais, especialmente quando expostos ao VPA no 12º dia gestacional	Kim <i>et al.</i> (2011)

	Padrões comportamentais anormais que foram revertidos pela administração crônica de ginseng vermelho coreano	Kim <i>et al.</i> (2012)
500 mg/kg	Diminuição da excitabilidade intrínseca de neurônios piramidais	Rinaldi <i>et al.</i> (2008)
	Hiper-reatividade da amígdala associada ao seu envolvimento na consolidação da memória do medo	Markram <i>et al.</i> (2008)
	Redução do número de células no córtex pré-frontal, mas não no córtex somatossensorial de fêmeas	Hara <i>et al.</i> (2012)
600 mg/kg	Aumento da atividade locomotora e do número de células cerebelares e hipocampais	Yochum <i>et al.</i> (2008)
	Aquisição precoce e maior magnitude de resposta condicionada	Murawski <i>et al.</i> (2009)
	Padrões comportamentais anormais, formação de marcadores de estresse oxidativo e histoarquitetura cerebelar alterada	Sandhya <i>et al.</i> (2012)
800 mg/kg	Hiperatividade da transmissão dopaminérgica associada à tarefa de natação forçada	Nakasato <i>et al.</i> (2008)
	Atraso no desenvolvimento físico. Padrões comportamentais anormais	Rouillet <i>et al.</i> (2010)
	Desenvolvimento anormal e imunorreatividade reduzida de nervos cranianos	Tashiro <i>et al.</i> (2011).

Fonte: Adaptado do Jornal Brasileiro de Psiquiatria, 2013.

### 3.3.2.3 Estado nutricional materno

O estado nutricional materno e o índice de massa corporal (IMC) têm sido apresentados como grandes moduladores do neurodesenvolvimento embrionário. Tais relações foram comprovadas pelo caso-controle apresentado por Getz *et al.* (2018), no qual mães obesas e também com baixo índice de massa corporal (IMC) foram associadas com um aumento da incidência do TEA.

Além disso, o estudo de Taylor *et al.*, (2014), aponta que mães diagnosticadas antes das 26 semanas de gestação com Diabetes Mellitus Gestacional, assim como mães diabéticas, hipertensas e portadoras de síndrome metabólica podem apresentar um risco aumentado para a ocorrência de autismo em sua prole (Karimi *et al.*, 2017). Outro aspecto nutricional das mães, também relacionado a micronutrientes, é a falta de ferro. Sua ausência desde o período da pré-concepção está associada com a dificuldade na produção de neurotransmissores, mielinização e função imunológica,

promovendo dificuldade cognitiva no aprendizado da fala e coordenação motora, além de dificuldades de interação social (Gialloreti *et al.*, 2019).

#### 3.3.2.4 Exposição à agentes ambientais

Durante o período pré-natal, diversos outros fatores podem estar associados ao desenvolvimento do TEA, inclusive os agentes ambientais químico-tóxicos que nos últimos anos vêm sendo relacionados com o aumento da incidência de TEA. Estão inclusos nesse grupo metais pesados, pesticidas, materiais utilizados para a produção de plásticos e até mesmo o ar poluído (Kim *et al.*, 2019; Goodrich *et al.*, 2019).

A ação do ar poluído como fator de risco para o desenvolvimento de TEA possivelmente seja o aspecto mais bem consolidado já demonstrado pela neurociência (LAM *et al.*, 2016). Sua maior ação à nível cerebral ocorre no terceiro trimestre (LAM *et al.*, 2016), mediada por múltiplas variáveis como extensão da exposição e tipo de poluição.

Ao contrário dos fatores genéticos que são irreversíveis, os fatores ambientais são modificáveis e já foram identificados como fatores de risco para o desenvolvimento do TEA. A exposição precoce às toxinas ambientais já foi identificada no aumento da ocorrência de autismo. Estudos com animais já comprovaram a existência de alterações comportamentais semelhantes ao TEA em filhotes de ratos após a exposição materna a altos níveis de glifosato, um componente pesticida (PU *et al.* 2021). Uma revisão sistemática realizada em 2015, identificou a influência da exposição prematura, desde o período pré-concepcional até o primeiro ano de vida da criança, especialmente aos agrotóxicos agrícolas e sua possível relação com o TEA. Os resultados dessa revisão mostraram altas taxas de associação entre a exposição precoce a pesticidas agrícolas e o TEA, incluindo o risco de desenvolver o TEA com a comorbidade de deficiência intelectual devido a interferência no neurodesenvolvimento. Embora os pesticidas controlem a retenção de pragas agrícolas, há substâncias que podem ter impacto negativo na saúde humana a longo prazo (FELICE *et al.* 2015).

A ação de agentes ambientais sobre a incidência do TEA não somente se justifica por suas modificações genéticas e epigenéticas, mas também ao seu papel como gatilho na neuroinflamação e estresse oxidativo, capazes de tornar a

neurotransmissão e neurobiologia anormal. É interessante ressaltar que estudos realizados em diferentes continentes possuem diferentes resultados, até mesmo controversos (Gialloreti *et al.*, 2019).

### **3.4 Fatores protetivos**

Diferentemente dos fatores causais, os fatores protetivos do autismo são pouco elucidados pela ciência, e pouco estudados, portanto, demonstram pouco valor científico. Porém, estudos como o de Karimi *et al.*, (2017), demonstraram que o uso de ácidos graxos insaturados, como ácido linoleico, ômega-3, ômega-6 são de extrema importância para o neurodesenvolvimento intrauterino, promovendo uma boa transdução e expressão genética, assim como um bom desenvolvimento da retina, principalmente nos primeiros 2 meses de gestação. Igualmente, o uso de ácido fólico no primeiro trimestre também age de forma protetiva, contra o risco de autismo.

Um outro suplemento utilizado com grandes chances de causar redução de risco é a melatonina, que frequentemente está diminuída na mãe e no bebê autista. Seu uso pode ser visto como um neuroprotetor em potencial (Gialloreti *et al.*, 2019).

Por fim, é indiscutível a importância do aleitamento materno em diversos aspectos do desenvolvimento neuropsicomotor da criança. Com relação à proteção e redução do risco para a ocorrência do TEA, não é diferente. A amamentação é fator protetivo crucial (Gialloreti *et al.*, 2019).

### **3.5 Tratamento**

#### **3.5.1 Terapias comportamentais**

Para determinar a intervenção apropriada para o desenvolvimento da criança com TEA, trabalha-se o clínico comportamental com a família e o paciente. O programa ABA (em português: Análise do Comportamento Aplicada) busca abordagens estruturadas, assim como treinamentos e instruções aos responsáveis para a melhoria do desenvolvimento neurocognitivo e social da criança (Lock *et al.*, 2015).

A terapia ABA envolve o ensino intensivo e individualizado das habilidades

necessárias para que a criança autista possa adquirir independência e a melhor qualidade de vida possível. Sua utilização precoce tem demonstrado bons resultados no desenvolvimento da criança (Roane *et al.*, 2016).

Outra forma de terapia é a tecnologia de forma assistida. A comunicação e a interação das crianças com TEA pode ser complementada por meio de dispositivos e tablets eletrônicos. O PECS (Picture Exchange Communication System), por exemplo, é um programa que usa símbolos de figuras para ensinar habilidades de comunicação ou geração de fala (Smith *et al.*, 2015).

### 3.5.2 Tratamentos dietéticos e Resveratrol

Os alimentos e seus fitoquímicos ativos são utilizados na prevenção, cura e/ou manejo de vários distúrbios neurológicos, sejam de seu desenvolvimento ou de doenças neurodegenerativas e outras disfunções neuronais. Algumas revisões sistemáticas de 2017 a 2019 sugerem o uso de suplementos vitamínicos ou minerais e remoção de certos alimentos da dieta de uma criança com TEA. Essa terapia baseia-se no fato de que alguns sintomas do TEA podem estar relacionados a alergias alimentares ou falta de vitaminas (Main *et al.*, 2010). Níveis aberrantes de vários marcadores nutricionais, como por exemplo, a metionina, homocisteína, cisteína e a glutatona total, que contribuem para uma adequada função celular e imunológica, têm sido observados em indivíduos com TEA (Main *et al.*, 2010). Há alguns relatos de que essas dietas trazem diferença na maneira como pacientes com TEA interagem ou em como se sentem.

O ômega-3 possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, tornando-o alvo devido a sua importância no neurodesenvolvimento. Já foi observado que crianças e prematuros com TEA quando tratados com ômega-3 obtiveram redução dos sintomas e aumento de utilização de gestos em comparação com placebo (Sheppard *et al.*, 2017). Em estudos com adolescentes, os resultados são inconsistentes ou negativos, sugerindo que ensaios clínicos randomizados maiores podem levar a resultados mais significativos (Ooi *et al.*, 2015).

O Resveratrol (3,5,4 ' trihidroxiestilbeno) é um polifenol presente em inúmeras espécies de plantas, especialmente na pele e nas sementes das uvas da espécie *Vitis labrusca*. Estudos enfatizam os papéis protetores e terapêuticos do resveratrol em

diversas patologias, destacando o anti-inflamatório, antioxidante e neuroprotetor do resveratrol (Berman *et al.*, 2017). Modelos animais com TEA já relataram o efeito preventivo do tratamento pré-natal com resveratrol, possuindo eficácia na prevenção de danos cerebrais como antioxidante, melhorando resultados clínicos na irritabilidade e outros sintomas associados ao TEA (Deckmann *et al.*, 2021).

### 3.5.3 Tratamento medicamentoso

Em relação aos déficits sociais centrais do TEA, o desenvolvimento de medicamentos no autismo é dificultado pela ausência de biomarcadores estabelecidos na doença e mecanismos fisiopatológicos subjacentes ainda não unificados. Teorias das diferentes vias neurobiológicas geradoras do fenótipo do TEA são citadas para uma melhor compreensão no desenvolvimento do tratamento farmacológico (Posey *et al.*, 2008).

O fenótipo do autismo é, na maioria das vezes, predisposto a irritabilidade e agressividade, os quais recebem tratamento com antipsicóticos, principalmente os atípicos, risperidona e aripiprazol, aprovados pelo FDA. O haloperidol também já foi discutido em alguns estudos como alternativa farmacológica para redução dos sintomas comportamentais e de impulsividade, mostrando-se eficaz em melhorar habilidades de comunicação. No entanto, a segurança da medicação foi questionada, retirando-o da escolha principal para o tratamento do TEA. Vários estudos já demonstraram que a risperidona é eficaz no tratamento dos sintomas de TEA, sendo o benefício abrangente nas fases de curto e longo prazo e abstinência. No entanto, há o cuidado com os efeitos colaterais incidentes que envolvem o uso dessa medicação, como, por exemplo, o aumento de peso (Maneeton *et al.*, 2018).

Comportamentos repetitivos e estereotipados têm sido difíceis de manejar farmacologicamente, sendo os inibidores da recaptura de serotonina, especificamente a fluvoxamina e fluoxetina, já citados como eficazes na redução desses comportamentos, mas sem respaldo em evidências (Wink *et al.*, 2010).

Os imunológicos também podem ser considerados como terapia medicamentosa no TEA, tendo como objetivo reduzir a atividade inflamatória e aumentar os mecanismos de regeneração neuronal (Parque *et al.*, 2009). A terapia celular com células tronco é capaz de amortecer mecanismos pró-inflamatórios e

aumentar a perfusão de áreas danificadas no sistema nervoso, pois podem promover a angiogênese (Burns *et al.*, 2009). Um estudo aberto comparando células mononucleares do sangue do cordão umbilical e de sangue humano com placebo revelou melhora na sintomatologia de crianças com TEA após 24 semanas de tratamento, no que diz respeito ao isolamento social, hiperatividade e comportamento estereotipado (Lv *et al.*, 2013). A suramina, um antiparasitário utilizado há mais de 100 anos, no que diz respeito a atividade imunológica, já foi avaliada como eficaz no alívio de sintomas do autismo em estudos com ratos, e também em baixas doses em ensaios clínicos, mostrando bons resultados na melhora do comportamento repetitivo e interação social de crianças com TEA (Naviaux *et al.*, 2017).

### **3.6 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes**

#### **3.6.1 Radicais Livres**

Radical livres (RL) são partículas instáveis geradas por processos fisiológicos que atuam como mediadores para a transferência de elétrons em vários processos bioquímicos (Barbosa *et al.*, 2010). Tal propriedade os torna altamente reativos a outras moléculas como proteínas, carboidratos, lipídios e DNA (Halliwell *et al.*, 2006).

Dentre os mecanismos de formação de Espécies Reativas ao Oxigênio (ERO) fisiológicos, a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a NADPH oxidase e a xantina oxidase são citadas como relacionadas à fontes primárias de partículas nos cardiomiócitos, enquanto a NADPH oxidase, a xantina oxidase, as lipoxigenases e as cicloxigenases são fontes primárias de partículas nas células vasculares (Kayama *et al.*, 2015). Os RL mais comumente relatados são o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), peróxil ( $ROO^{\bullet}$ ) e peróxil-lipídeo ( $LOO^{\bullet}$ ) (Luschak, 2015).

Seu benefício pode ocorrer em concentrações baixas a moderadas, enquanto os efeitos deletérios ocorrem em altas concentrações, onde a produção de radicais livres supera a capacidade antioxidante. O efeito deletério causado por EROs que resulta em danos biológicos é denominado estresse oxidativo. O excesso de EROs pode causar danos aos lipídios, proteínas ou DNA celulares, interrompendo sua função normal (Delwing *et al.*, 2006). Também pode danificar a membrana celular,

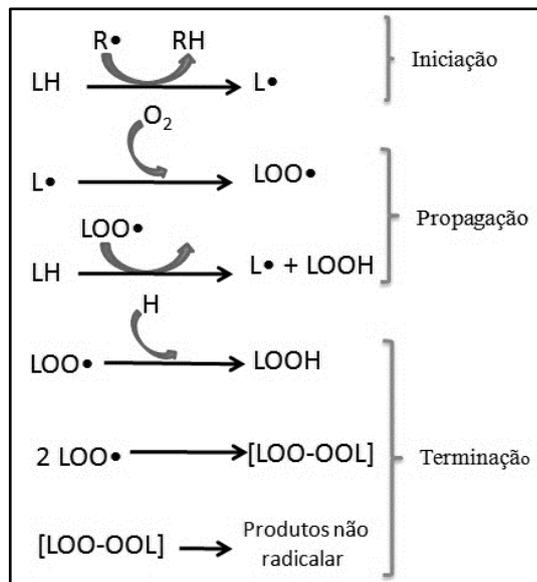
gerando peroxidação lipídica e alterando o transporte transmembrana (Obeagu, 2018).

### 3.6.2 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação

A peroxidação lipídica ocorre na célula ao sofrer danos consequentes dos radicais livres, podendo alterar a estrutura da membrana plasmática, reduzindo o transporte celular e consequentemente, morte celular por não haver liberação de enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos (Ferrari, 2011).

A Figura 1 mostra as etapas da lipoperoxidação:

Figura 1: Reações de Lipoperoxidação



Fonte: Halliwell *et al.*, 2007.

Na primeira etapa da reação de iniciação ocorre a abstração de um átomo de hidrogênio bisalílico da cadeia de lipídio ( $LH$ ) do PUFA por um radical livre reativo ( $R\cdot$ ), gerando um radical lipídico ( $L\cdot$ ) centrado de carbono. O radical lipídico ( $L\cdot$ ) formado reage rapidamente com o  $O_2$  formando um radical peroxila ( $LOO\cdot$ ). Esse radical pode reagir com outro  $LH$  gerando outro  $L\cdot$  e o hidroperóxido de lipídio ( $LOOH$ ), provocando a lipoperoxidação. No término da reação, dois radicais peroxila reagem entre si

formando um produto não radicalar ou o radical peroxila reage com outro radical livre formando uma ligação covalente.

Podem também participar do processo de peroxidação lipídica íons de  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$ , uma vez que catalisam reações do hidroperóxido de lipídio (LOOH) formando radicais  $RO\cdot$  e  $ROO\cdot$  que podem reagir com outra cadeia lipídica (LH) continuando a propagação, como demonstrado no esquema abaixo (Ferreira *et al.*, 1997).

- $LOOH + Fe^{2+} \rightarrow LO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$
- $LOOH + Fe^{3+} \rightarrow LOO\cdot + H^+ + Fe^{2+}$

### 3.6.3 Danos às proteínas

As proteínas são compostas por cadeias de aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (NELSON; COX, 2014) e são essenciais para o correto funcionamento do organismo e desempenham inúmeras funções biológicas.

O estresse oxidativo provoca mudanças físicas e biológicas das proteínas, aumentando sua fragmentação, agregação e suscetibilidade à degradação por proteossomos (Andrade *et al.*, 2005; Ferrari, 2011).

### 3.6.4 Danos ao DNA

Todas as moléculas orgânicas, incluindo o DNA, são suscetíveis a danos oxidativos de uma ampla variedade de espécies reativas à base de oxigênio ou nitrogênio. Células, órgãos e organismos utilizam uma ampla variedade de compostos antioxidantes, como vitaminas E e C, e uma infinidade de polifenóis; enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, peroxirredoxinas e glutaredoxinas; e cofatores enzimáticos redutores, como glutathione e tioredoxina, para tentar minimizar a quantidade de danos gerados por oxidação que ocorrem no DNA, nas proteínas e nos lipídios; no entanto, ocorrem danos substanciais diariamente (LEWIN *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 2006).

Os danos oxidativos ao DNA são ocasionados principalmente pela ação do radical  $OH\cdot$ , através de uma série de reações que consistem na formação de ligações

cruzadas de DNA e suas proteínas, oxidação da desoxirribose e quebra das duplas hélices (Nelson & Cox, 2014). A ação dos radicais livres sobre o DNA, principalmente do radical OH·, leva a alterações na expressão gênica do mesmo, propiciando o desenvolvimento de inúmeros processos patológicos crônicos, como câncer e doenças neurodegenerativas (Ferrari, 2011). Assim, encontramos enzimas proteolíticas (como o Proteassoma e a protease Lon mitocondrial) que podem reconhecer e degradar polipeptídeos danificados oxidativamente e removê-los das células antes que se agreguem e se reticulem e enzimas lipolíticas, como a fosfolipase A2 que pode reconhecer e remover seletivamente fosfolipídios oxidados das membranas biológicas. Além disso, proteínas e lipídios fortemente oxidados (muitas vezes em agregados reticulados de forma mista) que escaparam das enzimas proteolíticas e lipolíticas podem ser engolidos pelas células fagocíticas e degradados por um processo chamado autofagia (Davies, 2005).

Por mais impressionantes que possam ser estes sistemas de remoção de danos para proteínas e lipídios, eles simplesmente empalidecem em comparação com a vasta gama de enzimas que reconhecem e reparam, ou substituem, o DNA danificado por oxidação (Davies, 2005).

### 3.3.5 Antioxidantes e estresse oxidativo

O sistema de defesa antioxidante tem como função evitar ou reduzir os danos causados pelas EROs. Podem atuar na prevenção da formação das espécies reativas, impedindo a ação danosa das partículas existentes ou então reparando os danos já causados (Barbosa *et al.*, 2010). Esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático.

O sistema não enzimático é composto por substâncias endógenas ou adquiridas na dieta que possuem efeito antioxidante, como por exemplo o ácido ascórbico, vitamina E e C, resveratrol e componentes fenólicos (BARBOSA *et al.*, 2010), enquanto o sistema enzimático compreende os recursos antioxidantes existentes no organismo formados por enzimas altamente eficazes: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e por numerosas moléculas endógenas antioxidantes como glutathione (GSH) e cisteína (Godic *et al.*, 2014).

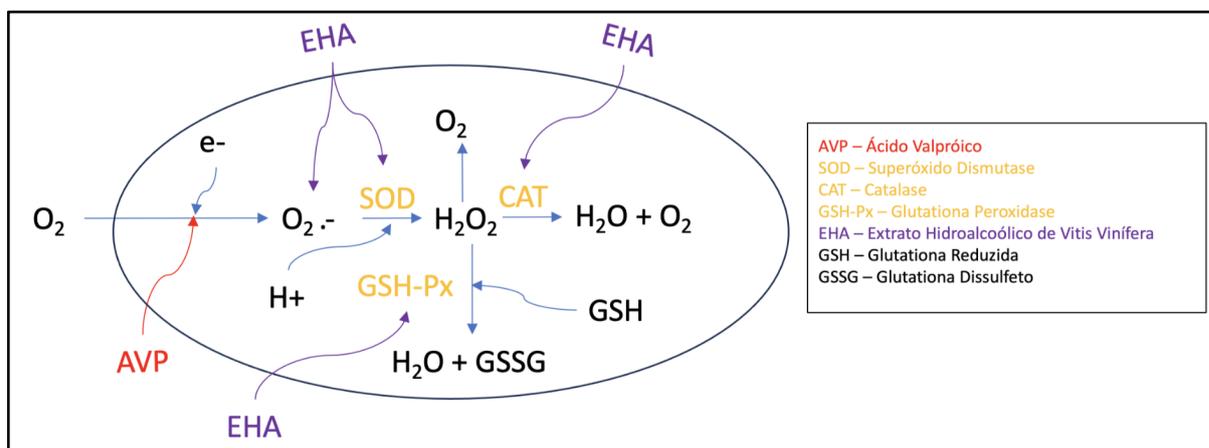
Devido ao alto consumo de  $O_2$  e a capacidade antioxidante limitada, o cérebro é vulnerável a danos oxidativos, inclusive pode ocorrer a lipoperoxidação, devido a alta disponibilidade de substrato, por ser rico em lipídios (NG *et al.*, 2008).

### 3.3.6 Autismo e estresse oxidativo

Numerosos estudos indicam a presença de estresse oxidativo em indivíduos com TEA (Rose *et al.*, 2012). A presença de RL produzidos por citocinas e xantina oxidase já foi encontrada na circulação sanguínea de pacientes autistas, podendo indicar um desequilíbrio no processo fisiológico do organismo. O aumento em especial de nitrito ( $NO\bullet$ ) em pacientes com TEA pode estar relacionado a lesão cerebral. Marcadores diretos de peroxidação lipídica e marcadores indiretos como fosfolipase A2 e perda de lipoproteína de membrana já foram relatados como presentes em maiores quantidades em portadores do autismo (Söğüt *et al.*, 2003). Os sinais muscarínicos protegem os neurônios do estresse oxidativo e da apoptose, podendo estar comprometidos em pacientes autistas e agravando o estresse oxidativo. Níveis de toxinas orgânicas, incluindo percloroetileno, hexano e pentano e metais pesados como mercúrio, chumbo e arsênico se mostraram acumulados nos pacientes com TEA (Sweeten *et al.*, 2003).

Os níveis de GSH e a atividade da GSH-Px, mostraram-se diminuídos nos lobos parietal e frontal e no cerebelo de pacientes autistas. A atividade da SOD demonstrou estar diminuída, aumentada ou inalterada no plasma e eritrócitos de autistas. Verificou-se que a atividade da SOD eritrocitária é maior em crianças com TEA do que no grupo controle do estudo em questão. A atividade da CAT mostrou-se reduzida nos eritrócitos, quando comparada aos grupos controles (Yenkoyan *et al.*, 2018). Tal alteração revela que a presença desses biomarcadores de estresse oxidativo em crianças com autismo, a capacidade antioxidante endógena se encontra reduzida. Em geral, metabólitos relacionados ao estresse oxidativo também podem ter uso potencial como biomarcadores para diagnóstico e ajudar a determinar futuras intervenções e tratamentos como demonstrado na Figura 2 (González-Fraguela, 2013).

Figura 2. Interação entre o Extrato Hidroalcoólico de *Vitis labrusca* (EHA), Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e algumas enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutaciona Peroxidase (GSH-Px) em uma mitocôndria exposta a ação exógena de Ácido Valpróico (AVP).



Fonte: Autoria Própria (2023).

### 3.3.7 Autismo e antioxidantes

O uso potencial de antioxidantes contra a toxicidade por RL tem sido um campo emergente no gerenciamento de muitas condições de desenvolvimento neurológico, incluindo o autismo. O papel de apoio dos antioxidantes e agentes anti-inflamatórios para reduzir a gravidade do autismo baseia-se na promoção da neurogênese funcional e neuroproteção no cérebro patológico da criança com TEA (Scandalios *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos provenientes do fruto da videira do gênero *Vitis* tem potenciais antioxidantes consideráveis para neutralizar radicais livres, atuando como potentes antioxidantes. O efeito do resveratrol, componente da semente da *Vitis vinífera e labrusca*, sobre a atividade de enzimas antioxidantes a nível cerebral já foi demonstrado em estudos com modelos animais, diminuindo lipoperoxidação e aumentando atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-Px, atuando como potencializador das propriedades neuroprotetoras ao regular as enzimas antioxidantes. O resveratrol demonstra também atividades antiplaquetária, vasodilatadora, anti-inflamatória e anticancerígena (Mokni *et al.*, 2007). Bhandari e Kuhad, em 2016, conseguiram demonstrar o aumento da GSH-Px e CAT pelo resveratrol na dose de 15mg/kg em um estudo experimental em ratos após serem

submetidos ao TEA.

Outros antioxidantes como a vitamina C, carnosina, zinco, GSH, óleo de peixe, melatonina e vitamina B6, em combinação com magnésio, já foram empregados em vários ensaios clínicos terapêuticos. A melatonina foi relatada como útil no tratamento de distúrbios do sono no autismo. Além disso, o tratamento com altas doses de vitamina C ou carnosina ou combinada com vitamina B6 e magnésio melhorou o comportamento de indivíduos com autismo (Rossignol, 2011).

Antioxidantes preventivos levam à proteção neuronal contra muitos danos oxidativos, podendo ser usados para tratar sintomas comportamentais e cognitivos do TEA. A ação desses fatores no TEA e o entendimento das alterações do estresse oxidativo e mecanismos no autismo podem levar a novos testes de diagnóstico e estratégias de intervenção terapêutica nos pacientes.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados cerca de 200 ratos machos Wistar expostos ainda no período pré-natal com ácido valproico. As fêmeas gestoras, no total de 7, foram induzidas uma única vez de forma intraperitoneal com 800 mg/kg do medicamento diluído em solução salina 0,9% no 12º dia de gestação conforme protocolo já utilizado por Nakasato *et al.*, 2008. (NAKASATO *et al.*, 2008). Antes do processo de experimentação, os animais foram para o biotério com 20 dias e foram mantidos em número máximo de quatro por gaiola contendo maravalha e aclimatados por 7 dias para adaptação em um novo meio. Foram mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro à temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais sugeridas pela Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade da Região de Joinville.

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”.

### **4.2 Obtenção dos extratos**

#### **4.2.1 Obtenção do material vegetal**

Frutos de *Vitis labrusca* orgânicas e não orgânicas roxas foram adquiridos no comércio local e imediatamente separados dos pedúnculos. Os grãos foram pesados, congelados e liofilizados para remoção da água.

#### **4.2.2 Preparação e obtenção do extrato bruto etanólico**

Após liofilizado, o material foi mecanicamente reduzido e extraído separadamente por variedade, através de maceração em álcool durante sete dias.

Este processo foi repetido duas vezes. Os extratos foram filtrados com auxílio de funil de Buchner acoplado com bomba a vácuo e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida aproximadamente em temperatura inferior a 60°C, e completando o procedimento até obter o material seco do extrato bruto

#### 4.2.3 Avaliação quantitativa dos metabólitos secundários

##### 4.2.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do reativo de Folin-Ciocalteu, da marca dinâmica, proposto por Anagnostopoulou *et al.*, (2006). As soluções do extrato foram testadas na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup> em metanol. A uma alíquota de 250 µL do extrato foram adicionados 2,5 mL de água destilada, 125 µL do reativo de Folin-Ciocalteu 2M e 0,5 mL da solução saturada de carbonato de sódio 15% (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Após uma hora de repouso, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro Shimadzu UV-visível em comprimento de onda de 725 nm. Uma solução em branco foi utilizada sem a presença da amostra, preparada conforme descrito acima. A concentração de fenóis totais foi estimada por interpolação por uma curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 15,62 até 250 µg mL<sup>-1</sup>, diluídas em metanol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação da equação da reta ( $y = 0,007x + 0,0445$ ,  $r^2 = 0,9989$ ). O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em mg de ácido gálico por g de extrato (mg AG g<sup>-1</sup> do extrato).

##### 4.2.3.2 Determinação do teor de flavonoides totais

Para a identificação de flavonoides, foi utilizada a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998). A uma alíquota de 0,5 mL de uma solução dos extratos brutos na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup> diluído em metanol, foram adicionados 2,5 mL de metanol e 0,5 mL de uma solução de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub> 2%). Após uma hora, as absorbâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm, utilizando metanol como branco. Para o cálculo do

teor de flavonoides nos extratos, foi construída uma curva de calibração utilizando quercetina como padrão nas concentrações de 15,62 até 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação da equação da reta ( $y = 0,0067x + 0,0618$ ,  $r^2 = 0,9975$ ). O teor de flavonoides foi expresso em mg de quercetina por g de extrato ( $\text{mg QUE g}^{-1}$  do extrato).

#### 4.2.3.3 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado colorimetricamente pelo método da vanilina usando catequina como padrão, proposto por Jayaprakasha et al., (2001). O reagente de vanilina foi preparado misturando quantidades iguais da solução de ácido clorídrico 8% em metanol com a solução de vanilina 1% em metanol (obtendo-se a mistura de 4% de HCl e 0,5% de vanilina). As amostras foram diluídas em metanol na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas as amostras e reagentes foram incubadas em banho-maria na temperatura 30°C durante 15 minutos antes de iniciar a reação. Num tubo de ensaio contendo 0,5 mL da amostra, foi adicionado 2,5 mL do reagente de vanilina. Uma solução branco foi preparada para cada amostra, utilizando uma solução de HCl 4% em metanol no lugar do reagente de vanilina para descontar a interferência da cor do extrato. Após, os tubos foram incubados no banho na temperatura de 30°C durante 20 minutos. As absorbâncias das amostras e branco foram medidas no comprimento de onda de 500 nm. A concentração de flavonoides totais foi estimada por interpolação por uma curva de calibração construída com soluções padrão de catequina nas concentrações de 31,2 até 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluídas em metanol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação da equação da reta ( $y = 0,0005x + 0,0089$ ,  $r^2 = 0,9983$ ). O conteúdo de flavonoides totais no extrato foi expresso como mg de catequina equivalente por g do extrato ( $\text{mg CAT g}^{-1}$ ).

#### 4.2.3.4 Análise de compostos fenólicos nos extratos por HPLC-ESI-MS/MS

A análise utilizando HPLC-ESI-MS/MS foi conduzida seguindo os parâmetros de pré-tratamento da amostra, cromatográficos e do espectrômetro de massa conforme previamente descritos por Borges *et al.* (2023). O eluente consistiu em uma mistura

dos solventes A (MeOH/H<sub>2</sub>O numa proporção de 95:5, v/v) e B (H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 0,1%) de acordo com o seguinte gradiente: 1ª etapa - 10% de solvente A e 90% de B (modo isocrático) por 5 minutos; 2ª etapa - gradiente linear dos solventes A e B (de 10 a 90% de A) por 2 minutos; 3ª etapa - 90% de solvente A e 10% de B (modo isocrático) por 3 minutos; 4ª etapa - gradiente linear dos solventes A e B (de 90 a 10% de A) por 7 minutos com uma taxa de fluxo de 250 µL min<sup>-1</sup> de fase móvel. Em todas as análises, o volume injetado foi de 5 µL.

As amostras dos extratos foram preparadas individualmente dissolvendo 50 mg do material liofilizado em uma solução de 5 mL de ácido clorídrico a pH 2. Essas soluções foram submetidas a três extrações com 2 mL de éter etílico cada, e o extrato etéreo resultante de três extrações de cada amostra foi combinado, seco e armazenado em um recipiente selado a -20°C. Antes da análise, o material seco foi dissolvido em 1 mL de MeOH, centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e então dissolvido em 10 partes de água ultrapura.

Para identificação e quantificação, 39 compostos fenólicos padrão foram analisados sob as mesmas condições mencionadas anteriormente. Esses compostos incluíam ácido abscísico, ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroximetilbenzoico, apigenina, ácido cafeico, catequina, ácido clorogênico, crisina, ácido cinâmico, coniferaldeído, eriodictiol, ácido ferúlico, fustina, ácido gálico, hispidulina, isoorientina, isoquercetina, ácido mandélico, ácido metoxifenilacético, naringenina, ácido p-anísico, ácido p-cumárico, pinocembrina, ácido protocatecuico, resveratrol, ácido rosmarínico, rutina, ácido salicílico, escopoletina, sinapaldeído, ácido sinápico, sinapaldeído, ácido siríngico, ácido taxifolínico, umbeliferona, 4-metilumbeliferona, ácido vanílico, vanilina e vitexina dissolvidos em metanol (variando de 0,02 a 6 mg L<sup>-1</sup>) (Borges *et al.*, 2023).

### 4.3 Protocolo Experimental

Primeiramente, as fêmeas gestoras receberam uma única administração de 800 mg/kg de AVP por via intraperitoneal diluído em solução salina 0,9%, no período pré-natal, no 12º dia de gestação, conforme protocolo já utilizado por Nakasato *et al.*, 2008 (NAKASATO *et al.*, 2008). Após o nascimento dos animais e quando estes alcançaram idade de desenvolvimento de 27 dias, foram submetidos a testes comportamentais de interação social e testes comportamentais de comportamento repetitivo. Os animais

que apresentaram comportamento tipo autista nessa etapa foram separados e utilizados para tratamento. Os animais receberam o tratamento com o EHA de uvas roxas orgânicas e não orgânicas por 15 dias consecutivos, via oral (gavagem), obedecendo a um intervalo de 24 horas entre um tratamento e outro (Tabelas 1 e 2) .

Os animais foram divididos em grupos, como segue abaixo:

**Grupo Controle salina (CONTROLE):** Animais que não sofreram indução durante período pré-natal de ácido valproico que receberam salina via intraperitoneal (IP), e tratados por 15 dias com salina via oral.

**Grupo Autismo controle (AUT controle):** Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico via IP com resultado compatível para o comportamento autista nos testes comportamentais, que foram tratados por 15 dias com salina via oral.

**Grupo C + EHA 30:** Animais que não sofreram indução durante período pré-natal de ácido valproico, tratados por 15 dias com EHA 30mg/kg da uva roxa orgânica via oral.

**Grupo AUT + EHA 30:** Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico com resultado compatível para o comportamento autista nos testes comportamentais, tratados por 15 dias com EHA 30mg/kg da uva roxa orgânica via oral.

**Grupo C + EHA 100:** Animais que não sofreram indução durante período pré-natal de ácido valproico, tratados por 15 dias com EHA 100 mg/kg da uva roxa orgânica via oral.

**Grupo AUT + EHA 100:** Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico com resultado compatível para o comportamento autista nos testes comportamentais, tratados por 15 dias com EHA 100 mg/kg da uva roxa orgânica via oral.

**Grupo C + EHA 150:** Animais que não sofreram indução durante período pré-natal de ácido valproico, tratados por 15 dias com EHA 150 mg/kg da uva roxa orgânica via oral.

**Grupo AUT + EHA 150:** Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico com resultado compatível para o comportamento autista nos testes comportamentais, tratados por 15 dias com EHA 150 mg/kg da uva roxa orgânica via oral.

**Tabela 2: Divisão dos grupos para indução do autismo e tratamento com EHA de uvas orgânicas.**

GRUPO (N=10)	INDUÇÃO	TRATAMENTO	DURAÇÃO
CONTROLE	Solução Salina	Solução Salina	15 dias
AUT CONTROLE	AVP	Solução Salina	
C + EHA 30	Solução Salina	EHA 30mg/kg	
AUT + EHA 30	AVP	EHA 30mg/kg	
C + EHA 100	Solução Salina	EHA 100mg/kg	
AUT + EHA 100	AVP	EHA 100mg/kg	
C + EHA 150	Solução Salina	EHA 150mg/kg	
AUT + EHA 150	AVP	EHA 150mg/kg	

**Grupo Controle (CONTROLE):** Animais que não sofreram indução durante período pré-natal de ácido valproico que receberam salina via intraperitoneal (IP), e tratados por 15 dias com salina via oral.

**Grupo Autismo controle (AUT controle):** Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico via IP com resultado compatível para o comportamento autista nos testes comportamentais, que foram tratados por 15 dias com salina via oral.

**Grupo AUT + EHA-I 30:** Animais que não sofreram indução durante período pré-natal de ácido valproico, tratados por 15 dias com EHA 30 mg/kg da uva roxa não orgânica via oral.

**Grupo AUT + EHA-I 30:** Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico com resultado compatível para o comportamento autista nos testes comportamentais, tratados por 15 dias com EHA 30 mg/kg da uva roxa não orgânica via oral.

**Grupo C + EHA-I 100:** Animais que não sofreram indução durante período pré-natal de ácido valproico, tratados por 15 dias com EHA 100 mg/kg da uva roxa não orgânica via oral.

**Grupo AUT + EHA-I 100:** Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico com resultado compatível para o comportamento autista nos testes

comportamentais, tratados por 15 dias com EHA 100 mg/kg da uva roxa não orgânica via oral.

**Grupo C + EHA-I 150:** Animais que não sofreram indução durante período pré-natal de ácido valproico, tratados por 15 dias com EHA 150 mg/kg da uva roxa não orgânica via oral.

**Grupo AUT + EHA-I 150:** Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico com resultado compatível para o comportamento autista nos testes comportamentais, tratados por 15 dias com EHA 150 mg/kg da uva roxa não orgânica via oral.

**Tabela 3: Divisão dos grupos para indução do autismo e tratamento com EHA de uvas não orgânicas.**

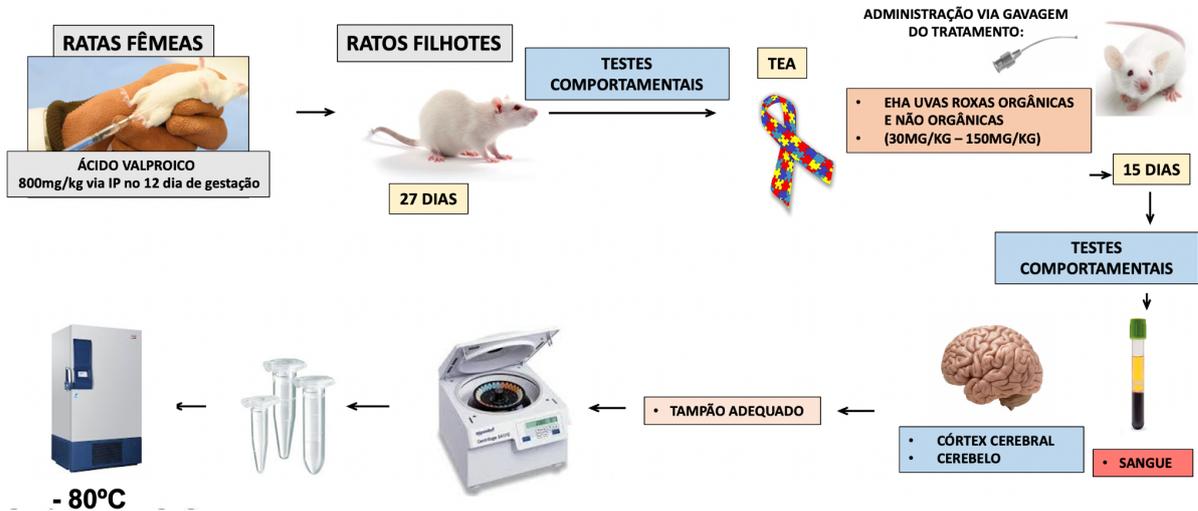
GRUPO (N=10)	INDUÇÃO	TRATAMENTO	DURAÇÃO
CONTROLE	Solução Salina	Solução Salina	15 dias
AUT CONTROLE	AVP	Solução Salina	
C + EHA-I 30	Solução Salina	EHA-I 30mg/kg	
AUT + EHA-I 30	AVP	EHA-I 30mg/kg	
C + EHA-I 100	Solução Salina	EHA-I 100mg/kg	
AUT + EHA-I 100	AVP	EHA-I 100mg/kg	
C + EHA-I 150	Solução Salina	EHA-I 150mg/kg	
AUT + EHA-I 150	AVP	EHA-I 150mg/kg	

A variedade de compostos fenólicos e a implicação em separá-los em orgânicos e não orgânicos foi preconizada no estudo por diversas pesquisas já referirem a diferença biológica dessas composições (Iglesias-Carres *et al.*, 2019).

Após 12 horas do último tratamento, os animais foram submetidos a novos testes comportamentais de interação social, comportamento repetitivo e olfatório para verificar a resposta motora e psicoterápica dos roedores ao tratamento estabelecido. Os animais foram sacrificados por decapitação na ausência de anestesia e em seguida foi coletado

o tecido nervoso (encéfalo) e o sangue para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo (Figura 3).

Figura 3: Demonstração do protocolo experimental para posterior análise.



Fonte: Autoria Própria (2023).

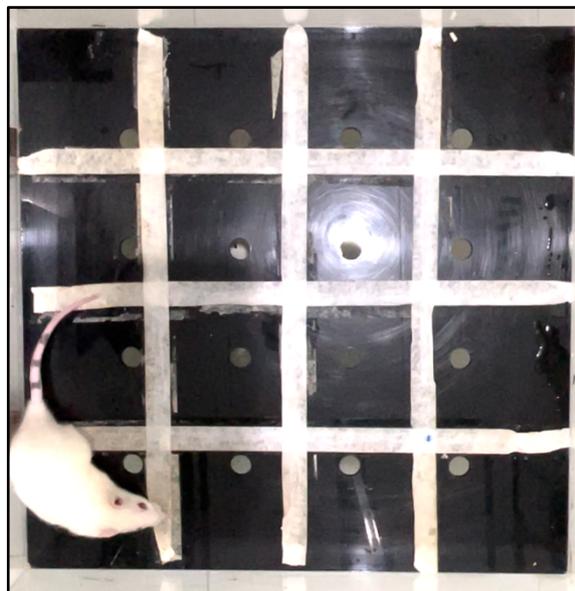
## 4.4 Testes comportamentais

### 4.4.1 Teste de campo aberto (TCA)

Trata-se de um teste para avaliação do comportamento exploratório e de locomoção dos animais estudados. O TCA, desenvolvido por Hall em 1934, é realizado em um aparato que consiste em uma arena quadrangular em acrílico transparente, medindo 45 cm × 45 cm, cercada por paredes de, aproximadamente, 22 cm de altura, de modo que o animal em teste não consiga fugir. Para facilitar a quantificação da atividade locomotora dos animais, o piso do campo aberto é dividido em nove quadrados idênticos, por entre os quais o animal irá circular primeiramente por 5 minutos para a adaptação. Após esse período, durante 10 minutos, são avaliados o número de cruzamentos realizados pelos animais entre os quadrados, a quantidade de vezes em que se apoiam somente em duas patas e o número de auto-limpezas, assim como o tempo total foi quantificado. O aumento no número de auto-limpezas foi considerado um indicativo de movimentos estereotipados, característica que é encontrada em indivíduos com TEA, os quais, comumente, realizam

movimentos repetitivos. As observações foram verificadas e contabilizadas de forma manual por um avaliador perante o tempo analisado de 10 minutos (Figura 4).

Figura 4: Teste de campo aberto utilizado e adaptado conforme Hall em 1934.



Fonte: Autoria Própria (2023).

#### 4.4.2 Teste de três câmaras para preferência e novidade social

Para o ensaio de sociabilidade, foi realizada uma adaptação do teste descrito por Karvat e Kimchi, 2012. Consiste em uma caixa retangular de três câmaras fabricada em policarbonato, com 70 cm × 24 cm × 29 cm. As câmaras laterais têm medidas de 25 cm × 24 cm × 29 cm e a câmara central foi de 15 × 24 × 29 cm. As paredes divisórias tem portas retráteis que permitem o acesso a cada câmara através de uma abertura de 6,5 cm × 6,5 cm. Para o ensaio de sociabilidade, foram utilizadas gaiolas de arame de fabricação própria com 14 cm de altura, com diâmetro de fundo de 13 cm e barras espaçadas de 1 cm. O teste consiste em 3 etapas consecutivas, de 5 minutos cada: habituação, preferência social e preferência por novidade social. No teste de habituação, o sujeito é colocado na câmara do meio, as portas foram abertas e o rato teste é autorizado a explorar a caixa. Depois disso, o rato teste é colocado no compartimento central e um objeto (novelo de lã) é colocado em outra gaiola em uma das câmaras laterais. Em seguida, o rato teste é novamente colocado no compartimento central e um animal desconhecido é colocado no mesmo ambiente do rato teste em uma das gaiolas laterais e deixado o objeto na outra câmara lateral,

sendo este o teste para novidade social, ou seja, observar a preferência do rato teste ao objeto já conhecido conforme adaptação ou a novidade social pelo rato desconhecido (Karvat e Kimchi, 2012) (Figura 5).

Figura 5: Teste de 3 câmeras realizado e adaptado conforme Karvat e Kimchi, 2012.

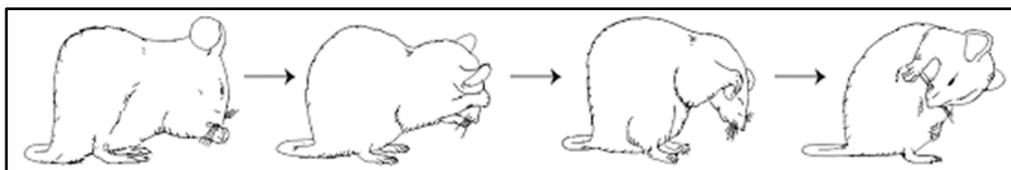


Fonte: Autoria Própria (2023).

#### 4.4.3 Teste de auto limpeza repetitivo

Teste de auto limpeza repetitivo é um teste para comportamento repetitivo ou comportamento estereotipado. Os ratos mostram estereotipias motoras espontâneas, incluindo movimentos de auto limpeza. A auto limpeza repetitiva foi observada em ratos induzidos por TEA quando borrifando um pouco de água (spray com produto branco) em sua área traseira. O tempo total gasto na limpeza da cabeça ou do resto do corpo durante 10 minutos foi registrado (Moretti *et al.*, 2013) (Figura 6).

Figura 6: Movimentação do animal no teste auto limpeza adaptado e seguindo Moretti *et al.*, 2013.

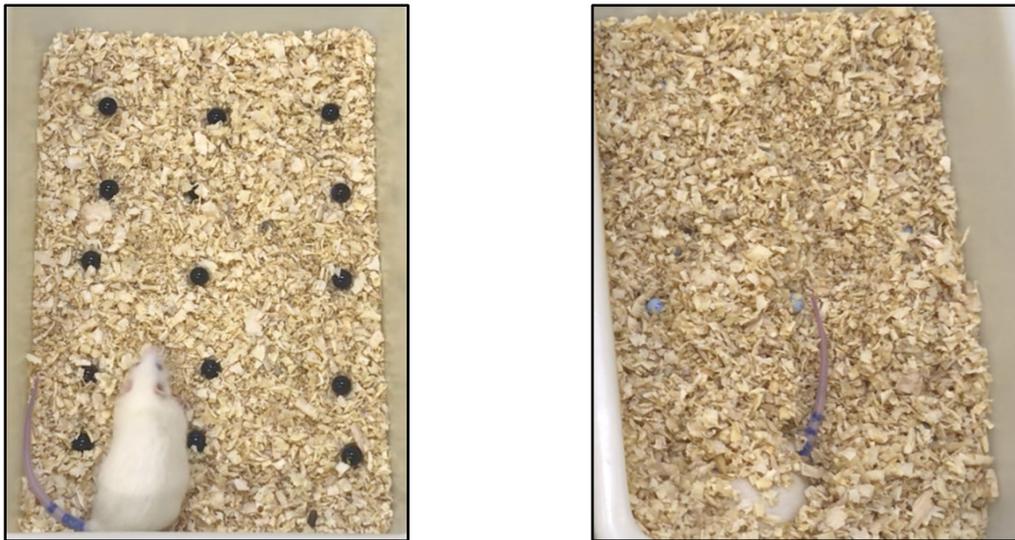


Fonte: Retirado e adaptado de Berridge, Aldridge, Houchard, & Zhuang, 2005.

#### 4.4.4 Teste de escavação

Utilizado para testar o comportamento repetitivo em ratos, observando a capacidade aumentada de escavação. A caixa de plexiglass foi preenchida com uma camada de serragem de 5 cm, seguida de 15 bolinhas de vidro coloridas (15 mm diâmetro) equidistantes em um arranjo 3×5. O teste durou um período de exploração de 3 minutos. O número de bolinhas desenterradas (> 50% de material de revestimento de mármore) foi então contado (Thomas *et al.*, 2009) (Figura 7).

Figura 7: Teste de escavação realizado e seguindo Thomas *et al.*, 2009.



Fonte: Autoria Própria (2023).

#### 4.4.5 Teste olfatório

O teste do olfato foi utilizado para avaliar a comunicação olfativa através de pistas sociais e não sociais. Foi realizada uma adaptação do Teste de Stack *et al.*, 2008, em que o animal é colocado em uma caixa limpa e habituado, por um período de 5 minutos com um algodão sem nenhum odor. Após esse período, o roedor recebe odores sociais e não sociais por cerca de 3 minutos cada um, observando-se o número de farejadas e a duração que o roedor fareja.

- Odor não social: algodão com extrato de baunilha
- Odor social: maravalha suja de sua gaiola correspondente

## 4.5 Estudos bioquímicos

### 4.5.1 Preparação dos tecidos

Para a análise dos parâmetros de estresse oxidativo, os ratos foram sacrificados por decapitação, sem anestesia, devido a interferência desta nos parâmetros de estresse oxidativo analisados (LEARY *et al.*, 2013), o cérebro foi rapidamente removido e o córtex cerebral e cerebelo foram dissecados e mantidos em gelo com tampão fosfato de sódio. O homogeneizado foi preparado em tampão adequado usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes, conteúdo total de sulfidrilas, conteúdo total de carbonilas e TBA-RS.

### 4.5.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma

Os eritrócitos e o plasma foram preparados a partir de amostras de sangue total obtidas de ratos (Lima *et al.*, 2017).

O sangue total foi centrifugado a 1,000 x g, o plasma foi separado e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L de cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes (Lima *et al.*, 2017).

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados três vezes e centrifugados a 13.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína (Lima

*et al.*, 2017).

#### 4.5.3 TBA-RS

TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.*, 1979. A metodologia de TBA-RS, mensura o Malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxila. As amostras são misturadas com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecidas num banho de água fervente durante 60 min. TBA-RS é determinado pela absorbância de 535 nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

#### 4.5.4 Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm num meio de reação contendo 25 µL de amostra e 600 µL de tampão de fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM. A absorbância foi lida a cada 10 segundos por 1 minuto e 40 segundos em espectrofotômetro. Uma unidade foi definida como 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

#### 4.5.5 Glutathione peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando *tert*-butilhidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 3 minutos e 30 segundos (espectrofotômetro Shimadzu UV-visível). 90 µL de cada amostra (eritrócitos ou homogenato de córtex e cerebelo) foi adicionado ao meio contendo 800 µL de tampão, 20 µL de GSH 2,0 mM, 30 µL de GSH redutase 0,15 U/mL, 10 µL de azida 0,4 mM e

10  $\mu\text{L}$  de NADPH 0,1 mM. A absorbância foi lida a cada 10 segundos por 1 minuto e 30 segundos. Posteriormente, 50  $\mu\text{L}$  de *tert*-butilhidroperóxido 0,5 mM foi adicionado e a absorbância foi lida por mais 2 minutos. Uma unidade de GSH-Px foi definida como 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi apresentada como unidades de GSH-Px/mg de proteína.

#### 4.5.6 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15  $\mu\text{L}$  de cada amostra, 215  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 50  $\mu\text{M}$  de tampão Tris, pH 8,2 foram adicionados à 1  $\mu\text{M}$  de EDTA e 30  $\mu\text{M}$  de CAT. Subsequentemente, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de pirogalol e a absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica foi relatada como unidades de SOD / mg de proteína.

#### 4.5.7 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que foi mensurado espectrofotometricamente em 412 nm. Resumidamente, 50  $\mu\text{L}$  de homogeneizado foi adicionado a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 30  $\mu\text{L}$  de DTNB 10 mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

#### 4.5.8 Conteúdo Total de Carbonilas

O teor de carbonilas foi verificado através do método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200  $\mu$ L de homogeneizado foi adicionado a tubos de plástico contendo 400  $\mu$ L de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). As amostras foram mantidas no escuro durante 1 h e agitadas em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 20% foi adicionado a cada tubo. A mistura foi submetida ao vórtex e centrifugada a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol / acetato de etila (1: 1 v / v), agitado e centrifugado a 14000 x g durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso em 600  $\mu$ L de guanidina 6 M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3), antes de agitação em vórtex e incubação a 60°C durante 15 min. As amostras foram em seguida centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante usado para medir a absorbância a 370 nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados foram relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol / mg de proteína).

#### 4.5.9 Dosagem de proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

#### 4.5.10 Análise Estatística

Os resultados para os diferentes grupos *in vivo* foram representados como média  $\pm$  desvio padrão, analisados no SPSS for Windows, versão 12 (SPSS, Chicago, IL, EUA), por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Duncan ou Teste de Kruskal Wallis, quando indicado, para comparação das médias dos grupos, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 5. INTERDISCIPLINARIDADE

A estimativa do aumento da prevalência do TEA corrobora com a necessidade da identificação precoce de sintomas para um possível tratamento especializado, visando melhores resultados. A equipe multidisciplinar no tratamento, formada por profissionais de diversas áreas faz parte de um desenvolvimento psicossocial melhor ao paciente, tanto na inclusão a nível escolar quanto na necessidade do diagnóstico correto e tratamento preventivo.

Uma terapia cognitivo-comportamental no TEA e o conhecimento sobre a alteração nos comportamentos desses indivíduos exige o ensino individualizado e uma equipe interdisciplinar com Pedagogia, Psicologia, Terapia Comportamental, Fonoaudiologia, Terapia Ocupacional, Integração Sensorial, Psicomotricidade e Arteterapia visando o envolvimento de várias áreas e profissionais tanto de ciências humanas quanto de saúde para uma abordagem do paciente com TEA a fim de melhorar o prognóstico do transtorno.

O entendimento das alterações clínicas e dos mecanismos envolvidos na patogênese do TEA, possibilita o conhecimento sobre os aspectos fisiológicos, comportamentais e também a patologia desse transtorno. O estudo sobre a influência dos extratos da Videira sobre o comportamento autista possibilita uma alternativa ao tratamento uma vez que, atuando como um potente antioxidante da família dos flavonoides pode melhorar o estresse oxidativo e trazer progressos no tratamento do TEA, reduzindo índices de morbidade e melhorando os aspectos sintomáticos da doença, além de possibilitar menos efeitos colaterais por ser um produto natural.

Além disso, a pesquisa com extratos da Videira pode auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos/suplementos, impulsionando a indústria farmacêutica, e, ainda, ser uma opção ao paciente com uma interface econômica mais acessível, não só visando a questão comercial, mas refletir em menor despesa pública, e levar a uma integração entre saúde e meio ambiente.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Artigo:

#### **EFEITOS ANTIOXIDANTE E COMPORTAMENTAL DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE UVAS ROXAS ORGÂNICAS E NÃO ORGÂNICAS EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPROICO**

Thayná Patachini Maia Becker<sup>1</sup>, Klaus Johann Jacques Schebek Teixeira<sup>2</sup>,  
Alessandra Betina Gastaldi<sup>1</sup>, Natalia Cavichioli<sup>1</sup>, Débora Delwing-Dal Magro<sup>3</sup>,  
Daniela Delwing-de Lima<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

\*Address for correspondence: Dra. Daniela Delwing-de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: [daniela.delwing@univille.br](mailto:daniela.delwing@univille.br); [danidelwing@hotmail.com](mailto:danidelwing@hotmail.com)

## RESUMO

Este estudo investigou os efeitos do extrato hidroalcoólico (EHA) de uvas roxas, orgânicas e inorgânicas (I) da espécie *Vitis labrusca*, em ratos com comportamento tipo- autista após exposição ao Ácido Valpróico. Os roedores passaram por testes comportamentais (comportamento repetitivo, interação social e olfatório) para verificar a resposta motora e psicoterápica ao autismo. Seguidamente receberam a administração de EHA (30mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg) ou EHA-I (30mg/kg, 100mg/kg e 150mg/kg) ou salina, via gavagem, por 15 dias e passaram novamente pelos testes comportamentais, sendo eutanasiados por decapitação para remoção de sangue total, córtex cerebral e cerebelo para análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas e de carbonilas, e da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Duncan ou Kruskal-Wallis, quando indicado ( $p < 0,05$ ). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIVILLE (CEUA 02/2022). Como resultados, o grupo autista exibiu estereotípias no teste de autolimpeza; o EHA e o EHA-I 150mg/kg reduziram comportamentos repetitivos. No teste de interação social, o grupo autista interagiu menos tempo com o animal e mais com o objeto. No campo aberto, houve menor atividade locomotora no grupo autista, indicando ansiedade, reduzida por EHA e EHA-I 150mg/kg. No teste de escavação, o grupo autista teve menor tempo de locomoção e escavação, revertido pelo EHA 100mg/kg. No teste de olfato, o grupo autista mostrou desinteresse na substância não social; e o EHA 150mg/kg aumentou o interesse. O modelo animal de autismo alterou os parâmetros de estresse oxidativo em sangue, córtex cerebral e cerebelo e o EHA de uvas roxas orgânicas e EHA-I de uvas roxas inorgânicas reverteram as mudanças no cérebro e sangue, indicando sua capacidade antioxidante.

**Palavras-chaves:** TEA, Modelo animal, *Vitis labrusca*, Testes comportamentais, Estresse oxidativo.

## 1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) evoluiu de uma condição rara para uma realidade notavelmente heterogênea. A compreensão da sua definição como um espectro que varia de grau leve a grave destaca a necessidade de apoio àquele diagnosticado ao longo da vida (Lord *et al.*, 2018). Apesar dos indivíduos diagnosticados com TEA serem muito distintos entre suas culturas, raças, etnias e grupos econômicos, o transtorno tem por característica padrões comuns de comunicação social e comportamentos sensório-motores restritos e repetitivos de início precoce, desenvolvimento cerebral alterado e reorganização neural (Lord *et al.*, 2018).

Seu diagnóstico baseia-se nos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Sociedade Americana de Psiquiatria (APA). Com o objetivo de facilitar o diagnóstico, agora existe um espectro único de TEA baseado em dois domínios: o da comunicação social e o dos comportamentos sensório-motores restritos, repetitivos ou incomuns (APA, 2014).

Segundo Rapin (2002), suas características clínicas e fenotípicas mais importantes, diretamente atreladas ao seu quadro fisiopatológico, são importantes déficits comportamentais e de comunicação social, comprometimento da linguagem ou incapacidade de falar, e forte tendência a padrões de comportamento estereotipados e repetitivos (Rapin, 2002).

Os distúrbios do desenvolvimento têm sido foco de estudos da neurociência por muitos anos (Bernardi *et al.*, 2011). Entretanto, nas últimas três décadas tem-se observado um aumento das pesquisas em torno do TEA (Matson *et al.*, 2014), principalmente com relação a seus fatores causais e manejo, justifica-se o acréscimo no número e intensidade de pesquisas com o aumento da incidência desse transtorno. Entre 2001 e 2011, como descreve Gialloreti *et al.* (2019), houve um incremento de 3.5 pontos percentuais na prevalência de autismo em crianças entre 2 e 17 anos.

Em estudos, o ácido valproico (AVP) aumentou significativamente a incidência de autismo em filhos de mães que fizeram uso deste medicamento durante o primeiro trimestre de gestação (Harden, 2013). Dados clínicos já demonstraram a exposição pré-natal de roedores ao AVP como modelo de autismo. Tendo como base esses estudos, um modelo animal induzido por administração de AVP tem por característica

a geração de proles com muitas características semelhantes à de indivíduos com TEA, como o comportamento repetitivo e estereotipado e o prejuízo na sociabilidade e na comunicação (Nunes, 2015).

Numerosos estudos mostram a presença de estresse oxidativo em indivíduos com TEA. A geração excessiva de radicais livres ocorre na circulação sanguínea de pacientes autistas, podendo provocar desequilíbrio no processo fisiológico do organismo (Rose *et al.*, 2012). Os antioxidantes causam proteção neuronal contra muitos danos oxidativos, podendo ser usados para tratar sintomas comportamentais e cognitivos do TEA.

Os compostos polifenólicos presentes em uvas, amendoim e no vinho tinto já foram relatados tendo um papel protetor e terapêutico em diversas patologias neurológicas, principalmente devido ao efeito neuroprotetor, antioxidante e anti-inflamatório (Berman *et al.*, 2017).

Estudos envolvendo o resveratrol, assim como outros polifenóis presentes em muitas espécies de vegetais, demonstraram aumento da atividade antioxidante cerebral em modelo animal, e quando ingerido em forma de vinho tinto, aumento na atividade de enzimas do metabolismo da glutathione (Mokni *et al.*, 2007; Martínez-Huélamo *et al.*, 2017). Estudos mostram que o resveratrol possui atividade neuroprotetora sobre as enzimas antioxidantes (Tang, 2010; Andrade *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento com resveratrol em modelos de animais com TEA, demonstrou-se preventivo em relação a sociabilidade e déficits sensoriais (Deckmann *et al.*, 2021).

A busca de novos métodos para o entendimento da fisiopatologia do TEA e o estudo dos fatores sociais e medicamentosos preventivos são ferramentas auxiliares das rotas biológicas da etiologia da doença. Nesse contexto, este estudo tem como objetivos reproduzir o comportamento tipo autista induzido pelo ácido valproico através de testes comportamentais e também mensurar os parâmetros de estresse oxidativo, podendo assim verificar efeitos protetores do extrato hidroalcoólico (EHA) nas concentrações de 30, 100 e 150 mg/kg de uvas roxas orgânicas e não orgânicas em cérebro e sangue de ratos machos Wistar.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Animais

Foram utilizados 200 ratos machos Wistar expostos no período pré-natal ao ácido valproico. As fêmeas gestoras foram induzidas, cerca de 7, uma única vez de forma intraperitoneal com 800 mg/kg do medicamento diluído em solução salina 0,9% no 12º dia de gestação, conforme protocolo descrito por Nakasato *et al.*, 2008 (NAKASATO *et al.*, 2008).

Antes do processo de experimentação, os animais foram para o biotério com 20 dias e foram mantidos em número máximo de quatro por gaiola contendo maravalha e aclimatados por 7 dias para adaptação em um novo meio. Foram mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro à temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais sugeridas pela Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental.

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”.

### 2.2 Obtenção dos extratos

Frutos de *Vitis labrusca* orgânicas e não orgânicas tintas foram adquiridos no comércio local provenientes da empresa Coopexvale e imediatamente separados dos pedúnculos. Os grãos foram pesados, congelados e liofilizados para remoção da água. Após liofilizado, o material foi mecanicamente reduzido e extraído separadamente por variedade, através de maceração em álcool durante sete dias. Este processo foi repetido duas vezes. Os extratos foram filtrados com auxílio de funil de Buchner acoplado com bomba a vácuo e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida aproximadamente em temperatura inferior a 60°C, e completando o procedimento até obter o material seco do extrato bruto.

## 2.3 Avaliação quantitativa dos metabólitos secundários

### 2.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do reativo de Folin-Ciocalteu, proposto por Anagnostopoulou *et al.* (2006). A concentração de fenois totais foi estimada por interpolação por uma curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 15,62 até 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluídas em metanol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação da equação da reta ( $y = 0,007x + 0,0445$ ,  $r^2 = 0,9989$ ). O teor de compostos fenólicos totais foi expresso em mg de ácido gálico por g de extrato ( $\text{mg AG g}^{-1}$  do extrato).

### 2.3.2 Determinação do teor de flavonoides totais

Para a identificação de flavonoides, foi utilizada a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998). A uma alíquota de 0,5 mL de uma solução dos extratos brutos na concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  diluído em metanol, foram adicionados 2,5 mL de metanol e 0,5 mL de uma solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$  2%). Após uma hora, as absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm, utilizando metanol como branco. Para o cálculo do teor de flavonoides nos extratos, foi construída uma curva de calibração utilizando quercetina como padrão nas concentrações de 15,62 até 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação da equação da reta ( $y = 0,0067x + 0,0618$ ,  $r^2 = 0,9975$ ). O teor de flavonoides foi expresso em mg de quercetina por g de extrato ( $\text{mg QUE g}^{-1}$  do extrato).

### 2.3.3 Determinação do conteúdo de flavanoides totais

O conteúdo de flavanoides totais foi determinado colorimetricamente por método da vanilina usando catequina como padrão, foi proposto por Jayaprakasha *et al.* (2001). A concentração de flavanoides totais foi estimada por interpolação por uma

curva de calibração construída com soluções padrão de catequina nas concentrações de 31,2 até 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluídas em metanol. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O ajuste linear foi confirmado pelo coeficiente de determinação da equação da reta ( $y = 0,0005x + 0,0089$ ,  $r^2 = 0,9983$ ). O conteúdo de flavanois totais no extrato foi expresso como mg de catequina equivalente por g do extrato ( $\text{mg CAT g}^{-1}$ ).

### 2.3.3 Análise de compostos fenólicos nos extratos por HPLC-ESI-MS/MS

A análise utilizando HPLC-ESI-MS/MS foi conduzida seguindo os parâmetros de pré-tratamento da amostra, cromatográficos e do espectrômetro de massa conforme previamente descritos por Borges et al. (2023). O eluente consistiu em uma mistura dos solventes A (MeOH/H<sub>2</sub>O numa proporção de 95:5, v/v) e B (H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 0,1%) de acordo com o seguinte gradiente: 1ª etapa - 10% de solvente A e 90% de B (modo isocrático) por 5 minutos; 2ª etapa - gradiente linear dos solventes A e B (de 10 a 90% de A) por 2 minutos; 3ª etapa - 90% de solvente A e 10% de B (modo isocrático) por 3 minutos; 4ª etapa - gradiente linear dos solventes A e B (de 90 a 10% de A) por 7 minutos com uma taxa de fluxo de 250  $\mu\text{L min}^{-1}$  de fase móvel. Em todas as análises, o volume injetado foi de 5  $\mu\text{L}$ .

As amostras dos extratos foram preparadas individualmente dissolvendo 50 mg do material liofilizado em uma solução de 5 mL de ácido clorídrico a pH 2. Essas soluções foram submetidas a três extrações com 2 mL de éter etílico cada, e o extrato etéreo resultante de três extrações de cada amostra foi combinado, seco e armazenado em um recipiente selado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes da análise, o material seco foi dissolvido em 1 mL de MeOH, centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e então dissolvido em 10 partes de água ultrapura.

Para identificação e quantificação, 39 compostos fenólicos padrão foram analisados sob as mesmas condições mencionadas anteriormente. Esses compostos foram o ácido abscísico, ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroximetilbenzoico, apigenina, ácido cafeico, catequina, ácido clorogênico, crisina, ácido cinâmico, coniferaldeído, eriodictiol, ácido ferúlico, fustina, ácido gálico, hispidulina, isoorientina, isoquercetina, ácido mandélico, ácido metoxifenilacético, naringenina, ácido p-anísico, ácido p-cumárico, pinocembrina, ácido protocatecuico, resveratrol, ácido rosmarínico, rutina, ácido salicílico, escopoletina, sinapaldeído, ácido sinápico, sinapaldeído, ácido

siringico, ácido taxifolínico, umbeliferona, 4-metilumbeliferona, ácido vanílico, vanilina e vitexina dissolvidos em metanol (variando de 0,02 a 6 mg L<sup>-1</sup>) (Borges et al., 2023).

## 2.4 Protocolo Experimental

Primeiramente, as fêmeas gestoras receberam 800 mg/kg de AVP diluído em solução salina 0,9%, por via intraperitoneal, uma única administração no período pré-natal (12º dia de gestação). A prole (27 dias) foi submetida a testes comportamentais e de comportamento repetitivo para verificar a resposta motora e psicoterápica dos roedores ao autismo. Os animais que apresentaram comportamento tipo autista nessa etapa foram separados e utilizados para tratamento. Os animais receberam o tratamento com o EHA de uvas roxas orgânicas e não orgânicas por 15 dias consecutivos, via oral (gavagem), obedecendo a um intervalo de 24 horas entre um tratamento e outro.

### 2.4.1 Administração do extrato

Os animais foram divididos em grupos com 10 animais por grupo, como segue abaixo:

As Tabelas 1 e 2 descrevem o protocolo experimental.

**Tabela 1: Divisão dos grupos para indução do autismo e tratamento com EHA de uvas roxas orgânicas**

GRUPO (N=10)	INDUÇÃO	TRATAMENTO (GAVAGEM)	DURAÇÃO
CONTROLE SALINA (C)	<b>Solução Salina</b>	<b>Solução Salina</b>	<b>15 dias</b>
AUT CONTROLE	<b>AVP</b>	<b>Solução Salina</b>	
C + EHA 30	<b>Solução Salina</b>	<b>EHA 30mg/kg</b>	
AUT + EHA 30	<b>AVP</b>	<b>EHA 30mg/kg</b>	
C + EHA 100	<b>Solução Salina</b>	<b>EHA 100mg/kg</b>	
AUT + EHA 100	<b>AVP</b>	<b>EHA 100mg/kg</b>	
C + EHA 150	<b>Solução Salina</b>	<b>EHA 150mg/kg</b>	
AUT + EHA 150	<b>AVP</b>	<b>EHA 150mg/kg</b>	

Adm: administração. EHA: extrato hidroalcoólico de uvas roxas orgânicas. AVP: ácido

valproico.

**Tabela 2: Divisão dos grupos para indução do autismo e tratamento com EHA de uvas roxas não orgânicas**

GRUPO (N=10)	INDUÇÃO	TRATAMENTO	DURAÇÃO
CONTROLE SALINA (C)	<b>Solução Salina</b>	<b>Solução Salina</b>	<b>15 dias</b>
AUT CONTROLE	<b>AVP</b>	<b>Solução Salina</b>	
C + EHA-I 30	<b>Solução Salina</b>	<b>EHA-I 30mg/kg</b>	
AUT + EHA-I 30	<b>AVP</b>	<b>EHA-I 30mg/kg</b>	
C + EHA-I 100	<b>Solução Salina</b>	<b>EHA-I 100mg/kg</b>	
AUT + EHA-I 100	<b>AVP</b>	<b>EHA-I 100mg/kg</b>	
C + EHA-I 150	<b>Solução Salina</b>	<b>EHA-I 150mg/kg</b>	
AUT + EHA-I 150	<b>AVP</b>	<b>EHA-I 150mg/kg</b>	

Adm: administração. EHA-I: extrato hidroalcoólico de uvas roxas não orgânicas. AVP: ácido valproico.

Após 12 horas do último tratamento, os animais foram submetidos a novos testes comportamentais de interação social, comportamento repetitivo e olfatório para verificar a resposta motora e psicoterápica dos roedores ao tratamento estabelecido. Os animais foram sacrificados por decapitação, na ausência de anestesia, devido a interferência desta no estresse oxidativo (LEARY et al., 2013), e em seguida o córtex cerebral e o cerebelo foram dissecados e o sangue total coletado para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo.

## 2.5 Testes comportamentais

### 2.5.1 Teste de Campo Aberto (TCA)

Trata-se de um teste para avaliação do comportamento exploratório e locomoção dos animais estudados. O TCA, desenvolvido por Hall em 1934.

### 2.5.2 Teste de três câmaras para preferência e novidade social

Para o ensaio de sociabilidade, foi realizada uma adaptação do teste descrito por Karvat e Kimchi, 2012.

### 2.5.3 Teste de auto limpeza repetitivo

Teste de auto limpeza repetitivo é um teste para comportamento repetitivo ou comportamento estereotipado foi utilizado e adaptado de Moretti *et al.*, 2013.

### 2.5.4 Teste de escavação

Utilizado para testar o comportamento repetitivo em ratos, observando a capacidade aumentada de escavação, foi utilizado e adaptado de Thomas *et al.*, 2009.

### 2.5.5 Teste olfatório

O teste do olfato foi utilizado para avaliar a comunicação olfativa através de pistas sociais e não sociais. Foi realizada uma adaptação do Teste de Stack *et al.*, 2008.

## 2.6. Estudos bioquímicos

### 2.6.1 Preparação dos tecidos

Para a análise dos parâmetros de estresse oxidativo, os ratos foram sacrificados por decapitação, na ausência de anestesia, o cérebro foi rapidamente removido e o córtex cerebral e o cerebelo foram dissecados e mantidos em gelo com tampão fosfato de sódio. O homogeneizado foi preparado em tampão adequado usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior

determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

### 2.6.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma

Os eritrócitos e o plasma foram preparados a partir de amostras de sangue total obtidas de ratos (Lima *et al.*, 2017). O sangue total foi centrifugado a 1,000 x g, o plasma foi separado e congelado para posterior determinação de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e conteúdo total de carbonilas. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes (Lima *et al.*, 2017). Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados três vezes e centrifugados a 13.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína (Lima *et al.*, 2017).

### 2.6.3 TBA-RS

TBA-RS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). A metodologia de TBA-RS, mensura o Malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxila. As amostras (plasma ou homogenato de córtex ou cerebelo) são misturadas com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecidas num banho de água fervente durante 60 min. TBA-RS foi determinado por absorbância em 535 nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

### 2.6.4 Catalase (CAT)

A atividade de CAT foi realizada pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm num meio de reação contendo reação contendo

25µL de amostra (eritrócitos ou homogenato de córtex ou cerebelo) e 600 µL de tampão de fosfato de potássio 10mM, pH 7,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20mM. A absorbância foi lida a cada 10 segundos por 1 minuto e 40 segundos no espectrofotômetro. Uma unidade foi definida como 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto e a atividade específica foi calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

#### 2.6.5 Glutathione peroxidase (GSH-Px)

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando *tert*-butilhidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 3 minutos e 30 segundos (espectrofotômetro Shimadzu UV-visível). 90 µL de cada amostra (eritrócitos ou homogenato de córtex ou cerebelo) foram adicionados ao meio contendo 800 µL de tampão, 20 µL de GSH 2,0 mM, 30 µL de GSH redutase 0,15 U/mL, 10 µL de azida 0,4 mM e 10 µL de NADPH 0,1 mM. A absorbância foi lida a cada 10 segundos por 1 minuto e 30 segundos. Posteriormente, 50 µL de *tert*-butilhidroperóxido 0,5 mM foram adicionados e a absorbância foi lida por mais 2 minutos. Uma unidade de GSH-Px foi definida como 1 µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi apresentada como unidades de GSH-Px/mg de proteína.

#### 2.6.6 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15 µL de cada amostra (eritrócitos ou homogenato de córtex ou cerebelo), 215 µL de uma mistura contendo 50 µM de tampão Tris, pH 8,2, foram adicionados à 1 µM de EDTA e 30 µM de CAT. Subsequentemente, foi adicionado 20 µL de pirogalol e a absorbância foi registada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma

unidade de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto-oxidação de pirogalol e a atividade específica foi relatada como unidades de SOD / mg de proteína.

#### 2.6.7 Conteúdo Total de sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que foi mensurado espectrofotometricamente em 412 nm. Resumidamente, 50  $\mu$ L de plasma ou homogenato de córtex ou cerebelo foram adicionados a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 30  $\mu$ L de DTNB 10mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

#### 2.6.8 Conteúdo Total de Carbonilas

O conteúdo total de carbonilas foi verificado pelo método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200  $\mu$ L de plasma ou homogenato de córtex ou cerebelo foram adicionados a tubos de plástico contendo 400  $\mu$ L de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). As amostras foram mantidas no escuro durante 1 h e agitadas em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 20% foram adicionados a cada tubo. A mistura foi submetida a vórtex e centrifugada a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol / acetato de etila (1: 1 v / v), agitado e centrifugado a 14000 x g durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso em 600  $\mu$ L de guanidina 6M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3), antes de agitação em vórtex e incubação a 60°C durante 15 min. As amostras foram em seguida centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante usado para medir a

absorbância a 370 nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados foram relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol / mg de proteína).

#### 2.6.9 Dosagem de proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

### 2.7 Análise Estatística

Os resultados para os diferentes grupos *in vivo* foram representados como média  $\pm$  desvio padrão, analisados no SPSS for Windows, versão 12 (SPSS, Chicago, IL, EUA), por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Duncan ou Teste de Kruskal Wallis, quando indicado, para comparação das médias dos grupos, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Extrato hidroalcoólico de uva roxa *Vitis labrusca*

##### 3.1.1 Caracterização química dos extratos

Para a caracterização química, foram realizados ensaios quantitativos e qualitativos para a identificação e quantificação de compostos fenólicos nas amostras. Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, especialmente devido à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana (SOETHE, *et al.*, 2016).

Observa-se que os resultados de fenóis totais da uva roxa não-orgânica encontram-se maiores que os da uva roxa orgânica, enquanto para os resultados de flavanois (catequinas) o resultado se inverte.

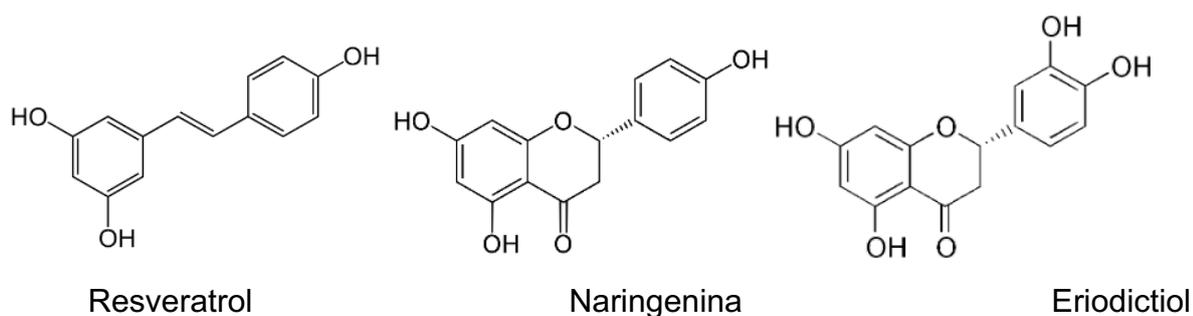
**Tabela 3.** Valores de quantificação de fenóis totais e flavanois totais nos extratos de uva analisados.

Amostra	Fenóis totais (mgAG/g)	Flavanois totais (mgCAT/g)
Orgânica	6,307 ± 0,65	14,22 ± 1,03
Não orgânica	8,978 ± 0,61	9,286 ± 0,00

Depois de utilizar as metodologias quantitativas para avaliar o teor total de compostos fenólicos e flavanois, realizou-se uma análise por HPLC-ESI-MS/MS para identificar e também quantificar individualmente os fenóis presentes nos extratos brutos das amostras.

Em relação à identificação dos compostos nos extratos, em comparação aos 39 padrões de compostos fenólicos utilizados no ensaio, puderam ser identificados 3 compostos: o resveratrol, um estilbeno; a naringenina e o eriodictiol, dois flavonoides da classe das flavanonas.

Abaixo estão representados os compostos fenólicos identificados nos extratos analisados.



Todos os três compostos foram identificados em ambos os extratos, mostrando que, em relação ao perfil de compostos analisados, não houve diferença entre as amostras. Porém, não foi possível quantificá-los, pois os compostos estão em concentração abaixo do limite de quantificação do método (< LOQ). Os parâmetros cromatográficos para os compostos identificados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros cromatográficos utilizados para a identificação dos compostos fenólicos nos extratos de *V. vinífera* analisados.

Composto	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Massa teórica	Massa experimental (M-H)	<i>ms/ms</i>	tR (min)
Resveratrol	0,14	0,43	228,25	226,9	142,9	10,87
Naringenina	0,01	0,04	272,25	270,9	151,0	11,86
Eriodictiol	0,05	0,16	288,25	286,9	151,0	11,38

LOD = Limite de detecção; LOQ = Limite de quantificação; Massa experimental (M-H), obtida em modo negativo; *ms/ms* = fragmentos de massa; tR = tempo de retenção cromatográfico do composto analisado.

### 3.1.2 Testes comportamentais

#### 3.1.2.1 Testes comportamentais nos grupos controles e autistas após administração do EHA e do EHA-I de uvas roxas orgânicas e não orgânicas.

Em relação ao teste de autolimpeza, conforme pode ser visualizado no gráfico 1A, o grupo AUT obteve um tempo maior de movimentação quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ), demonstrando um comportamento repetitivo maior e comprovando o modelo autista. Não obstante, entre os grupos autistas, o EHA de uvas roxas orgânicas demonstrou reversão parcial na concentração de 100 e 150mg/kg ( $p < 0,01$ ) e no EHA-I de uvas roxas não orgânicas (1B) - reversão total na concentração de 150mg/kg ( $p < 0,01$ ) nesse parâmetro analisado, mostrando benefício do extrato na estereotipia do TEA.

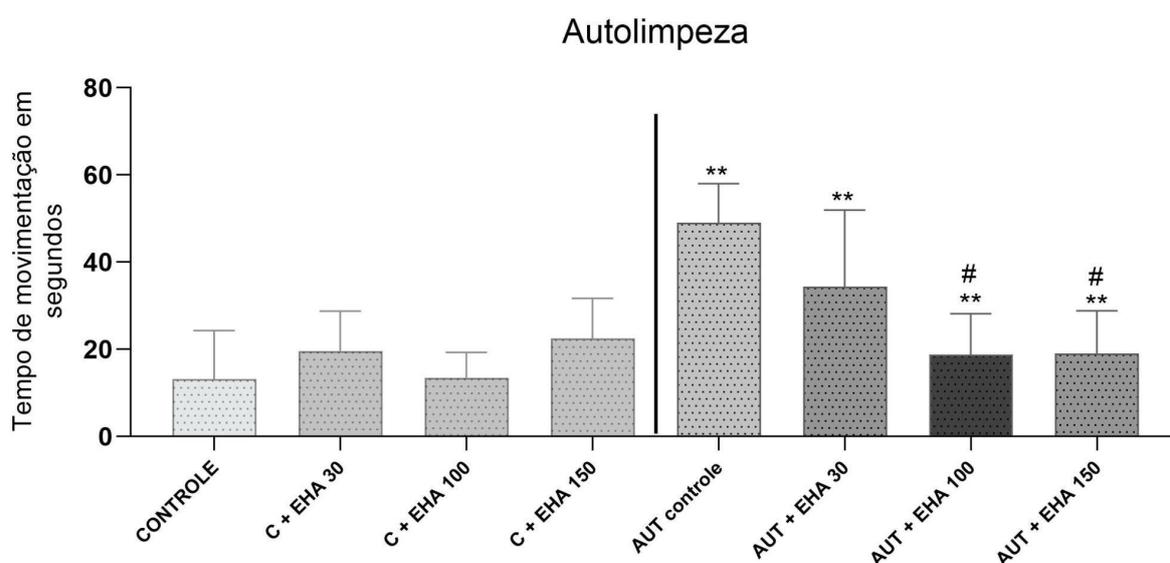


Gráfico 1A: Comparação do tempo de movimentação no teste de autolimpeza em segundos entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA de uvas roxas orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \*\* $p < 0,01$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle e \*\* $p < 0,01$  comparação entre os grupos tratamento com EHA com o grupo AUT controle; # reversão parcial.

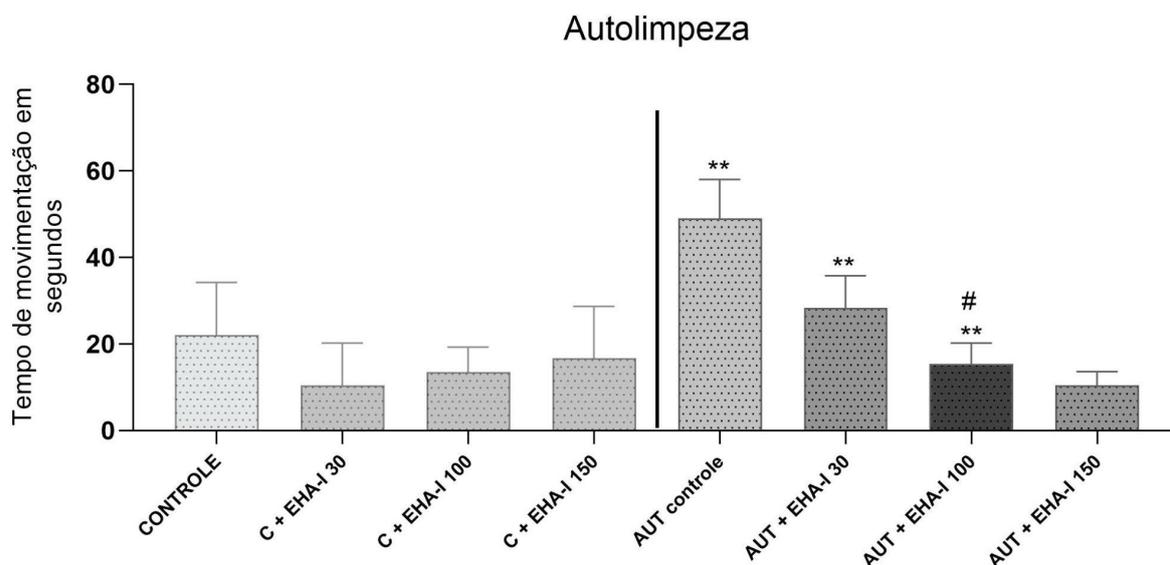


Gráfico 1B: Comparação do tempo de movimentação no teste de autolimpeza em segundos entre os grupos controles e efeito da administração do EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \*\* $p < 0,01$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle e \*\* $p < 0,01$ , comparação entre os grupos tratamento com EHA com o grupo AUT controle; # reversão parcial.

Considerando o teste de interação social (Gráfico 2 A1 e A2), na avaliação do tempo de interação com o animal, o grupo controle mostrou uma tendência em ter um maior tempo de interação quando comparado com o grupo autista ( $p < 0,05$ ).

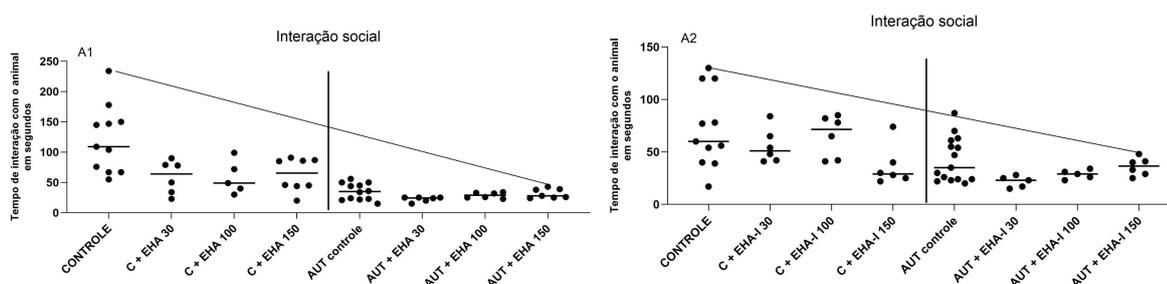


Gráfico 2 A1 e A2: Comparação do tempo de interação com o animal em segundos entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA de uvas roxas orgânicas (A1) e EHA-I de uvas roxa não orgânicas (A2) em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \* $p < 0,05$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle. Linha em decaimento quando comparado ao grupo controle e AUT + EHA 150 mg/kg,  $p < 0,05$ .

Na avaliação do tempo de interação com o objeto, como demonstrado no gráfico 3, o grupo AUT apresentou um maior tempo com o objeto do que o grupo controle

( $p < 0,05$ ). O EHA de uvas roxas orgânicas e o EHA-I de uvas roxas não orgânicas em todas as concentrações (30-150mg/kg) conseguiram reverter esse tempo quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O tempo sem locomoção e o tempo de autolimpeza não mostraram diferenças significativas no teste analisado ( $p > 0,05$ ).

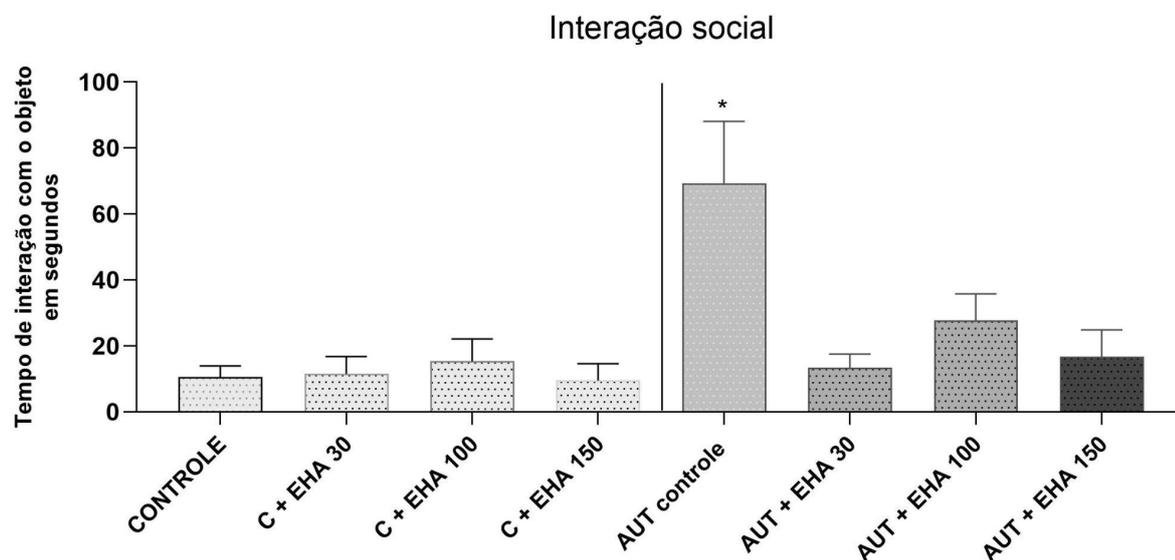


Gráfico 3A: Comparação do tempo de interação com o objeto em segundos entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA de uvas roxas orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \* $p < 0,05$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle.

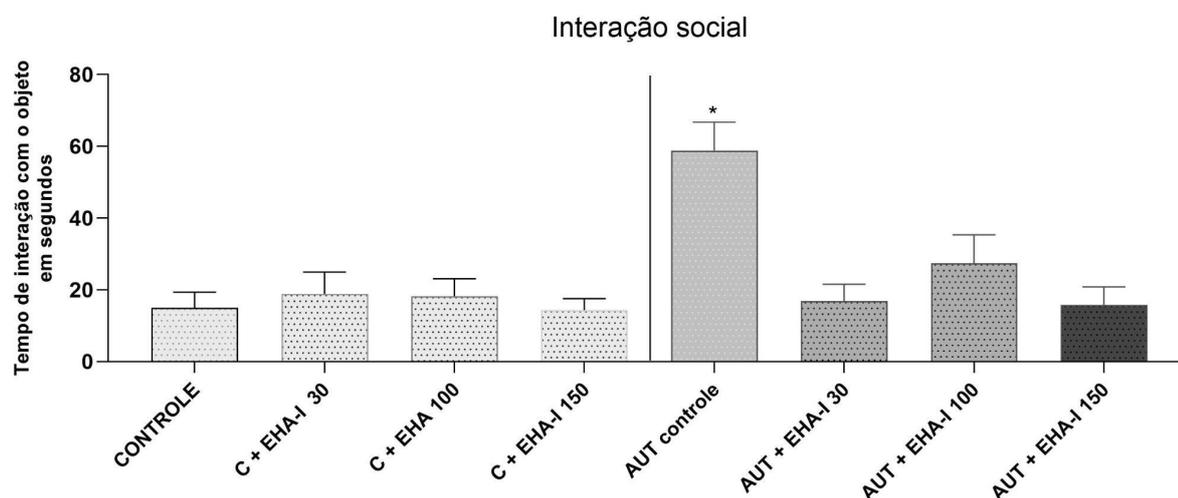


Gráfico 3B: Comparação do tempo de interação com o objeto em segundos entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \* $p < 0,05$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle.

Com relação ao teste de campo aberto (Gráfico 4A e 4B), o grupo AUT teve um tempo sem locomoção maior do que o grupo controle, durante o período analisado nos grupos EHA ( $p < 0,05$ ) e EHA-I ( $p < 0,001$ ), comprovando mais uma vez o modelo autista. Além disso, após a administração dos extratos, tanto no EHA de uvas roxas orgânicas quanto no EHA-I de uvas roxas não orgânicas, observou-se reversão parcial do tempo sem locomoção, quando comparado ao grupo controle.

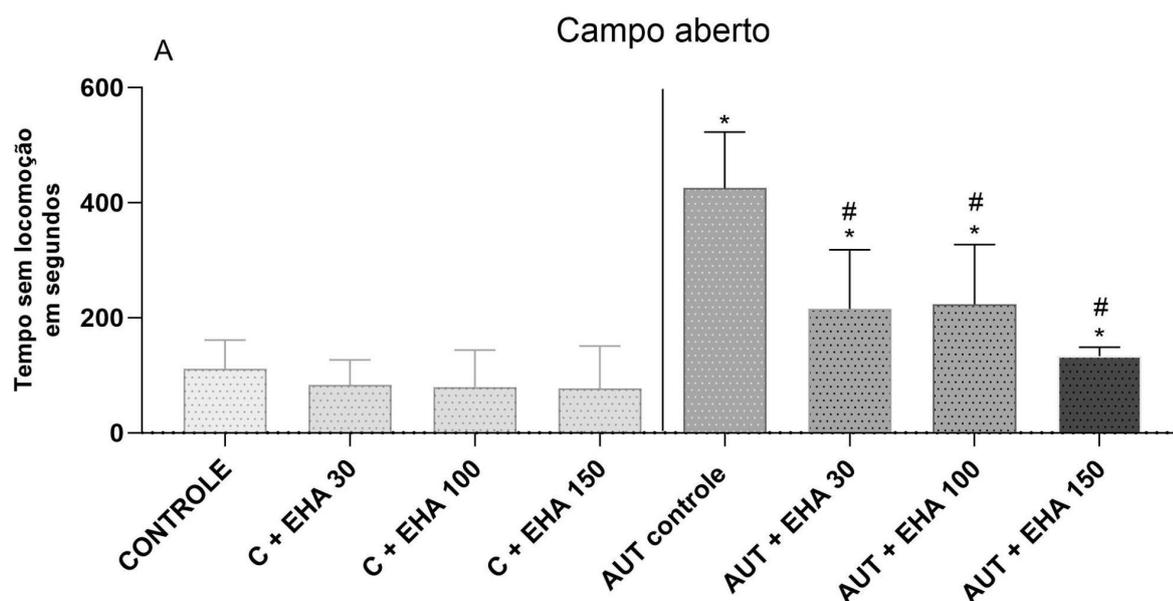


Gráfico 4A: Comparação do tempo sem locomoção durante o teste de campo aberto em segundos entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA de uvas roxas orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \* $p < 0,05$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle e \* $p < 0,05$ , comparação entre os grupos tratamento com EHA com o grupo AUT controle; # reversão parcial.

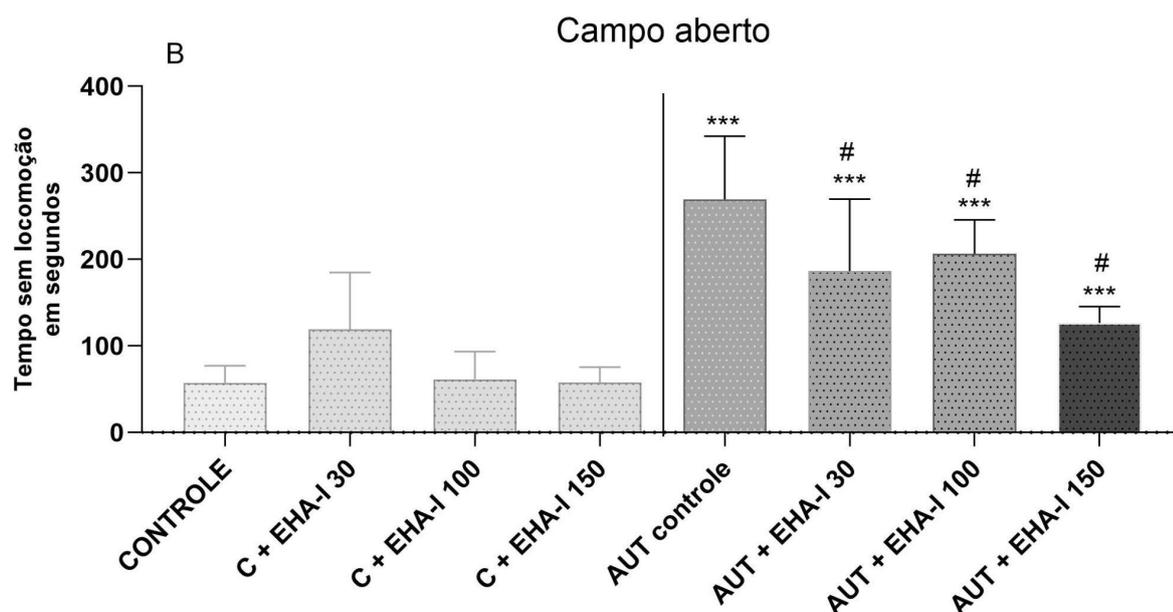


Gráfico 4B: Comparação do tempo sem locomoção durante o teste de campo aberto em segundos entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle e \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre os grupos tratamento com EHA-I com o grupo AUT controle; # reversão parcial.

No teste de enterramento das esferas de vidro (escavação), considerando a quantidade de esferas enterradas, pode-se observar no gráfico 5 (A e B) que obteve-se diminuição significativa no grupo AUT quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , A e B, respectivamente). Quando analisamos a reversão pelo EHA-I de uvas roxas não orgânicas, nos grupos autistas (Gráfico 5B), obteve-se um aumento da atividade de enterrar as esferas em todas as concentrações desse extrato (30-150mg/kg), mostrando reversão total desse parâmetro quando comparado ao grupo autista controle ( $p < 0,001$ ), e com o EHA de uvas roxas orgânicas houve reversão parcial deste parâmetro ( $p > 0,05$ ).

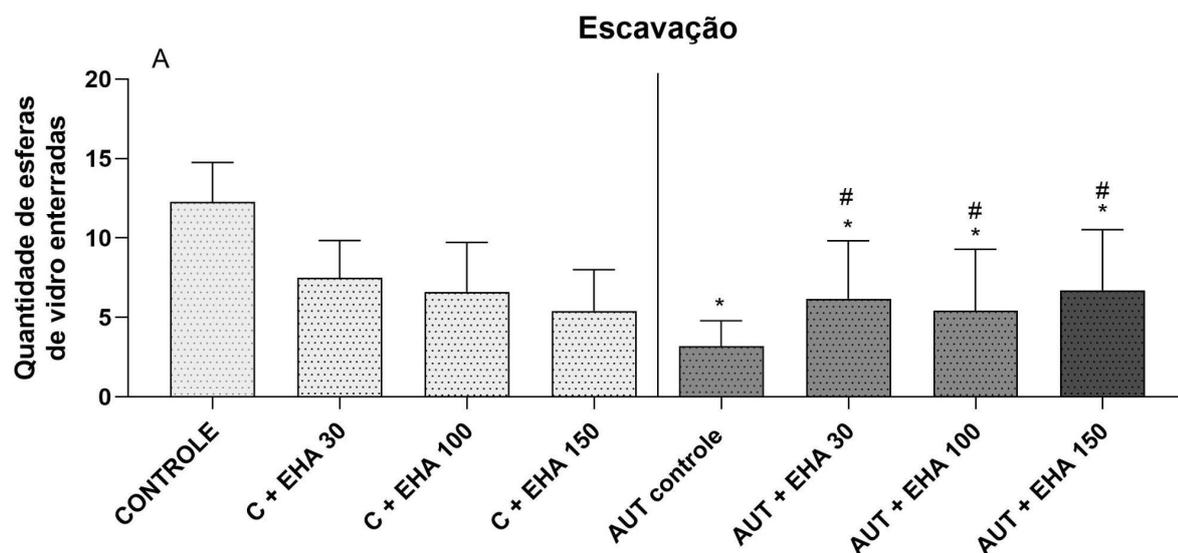


Gráfico 5A: Comparação da quantidade de esferas de vidro enterradas entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA de uvas roxas orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \* $p < 0,05$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle e \* $p < 0,05$ , comparação entre os grupos tratamento com EHA com o grupo AUT controle; # reversão parcial.

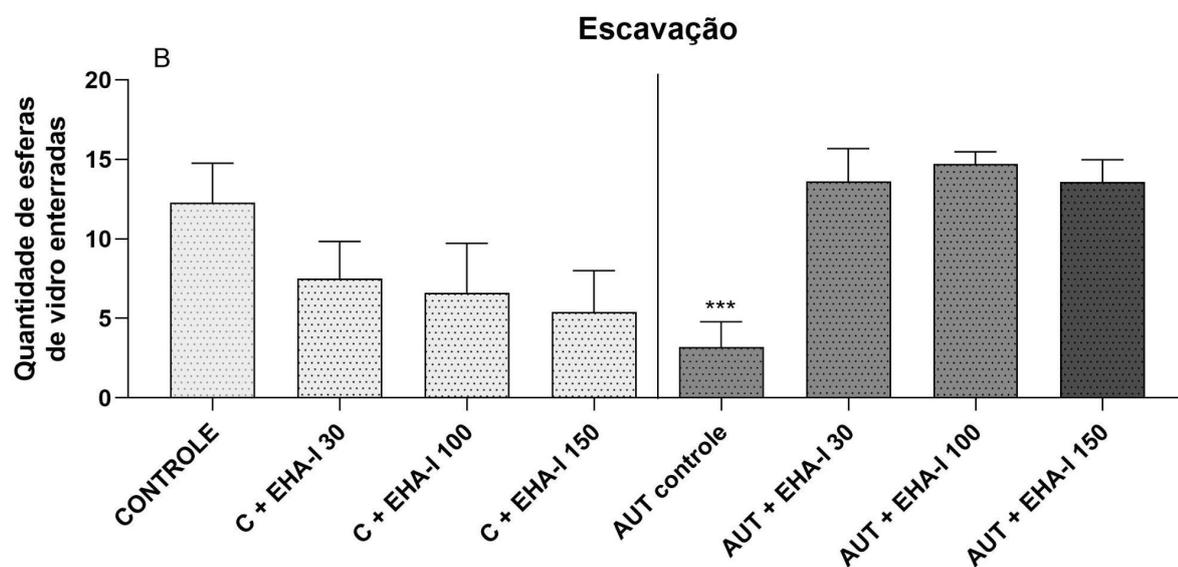


Gráfico 5B: Comparação da quantidade de esferas de vidro enterradas entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle.

Ainda no teste de escavação, quando analisado outro parâmetro do tempo sem locomoção, no gráfico 6 (A e B), foi possível analisar que o grupo AUT apresentou um aumento significativo no tempo sem locomoção quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , A e B, respectivamente). Além disso, a administração do EHA de uvas roxas orgânicas 150mg/kg (gráfico 6A) causou reversão total desse parâmetro, quando comparado ao grupo AUT controle ( $p < 0,05$ ), enquanto a administração do EHA-I de uvas roxas não orgânicas causou reversão parcial em todas as concentrações (30-150mg/kg) nos grupos autistas, quando comparado ao grupo AUT controle ( $p < 0,001$ ).

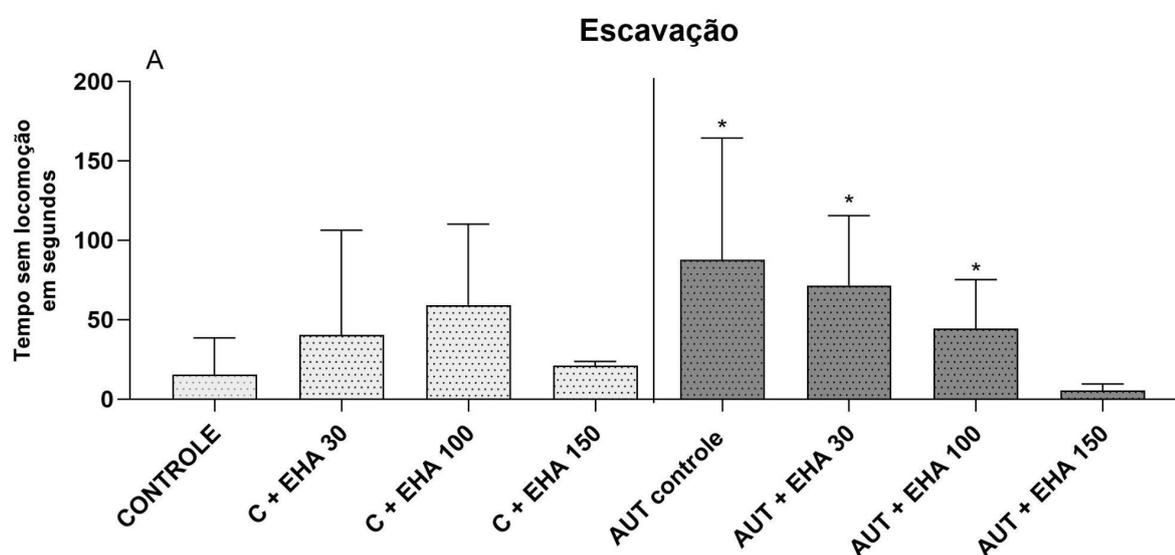


Gráfico 6A: Comparação do tempo sem locomoção no teste de escavação entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA de uvas roxas orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \* $p < 0,05$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle e \* $p < 0,05$ , comparação entre os grupos tratamento com EHA com o grupo AUT controle.

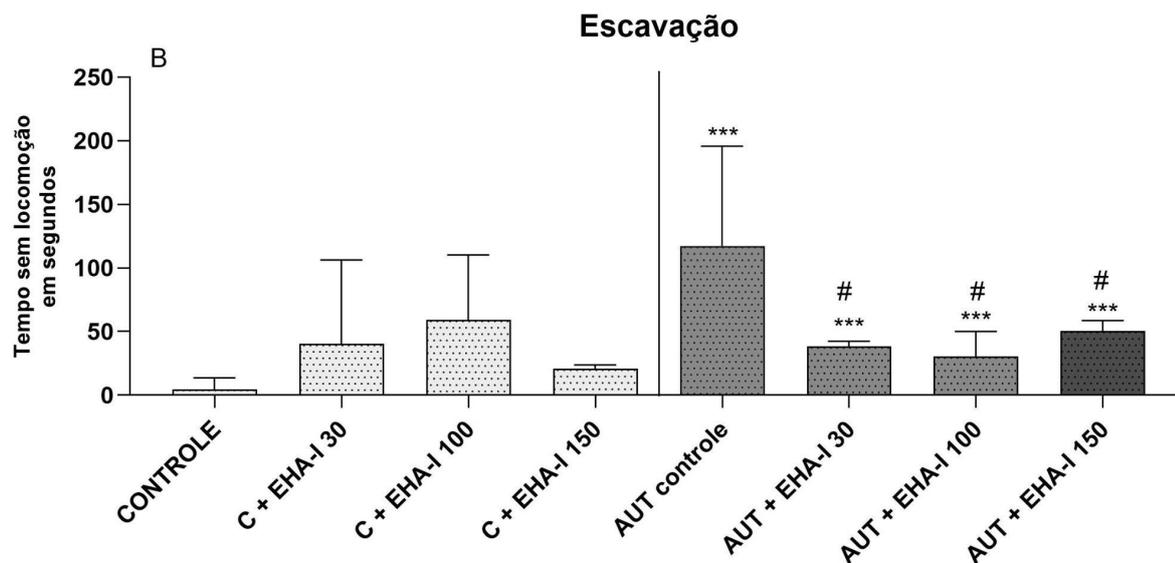


Gráfico 6B: Comparação do tempo sem locomoção no teste de escavação entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle e \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre os grupos tratamento com EHA-I com o grupo AUT controle; # reversão parcial.

Ainda no mesmo teste de escavação, foi analisado o tempo total de escavação dos animais (gráfico 7 A e B), em que os grupos AUT mostraram significativamente menor tempo [gráfico 7A ( $p < 0,01$ ) e B ( $p < 0,001$ )], quando comparado ao grupo controle. O EHA de uvas roxas orgânicas (gráfico 7A) em nenhuma das concentrações aumentou o tempo de escavação e o EHA-I de uvas roxas não orgânicas na concentração de 150mg/kg (gráfico 7B) causou reversão parcial deste parâmetro.

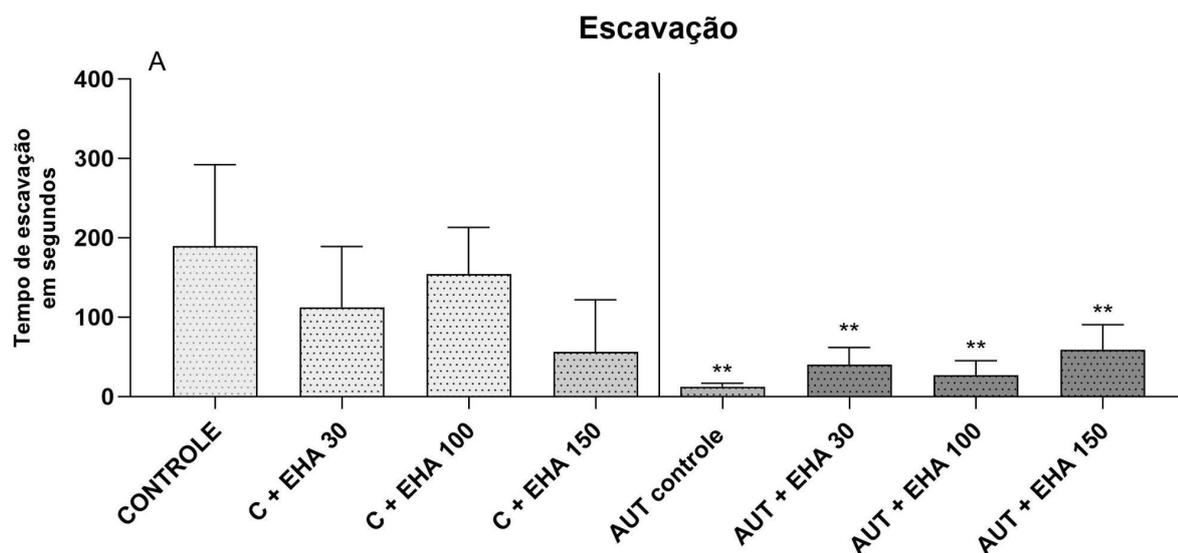


Gráfico 7A: Comparação do tempo de escavação total durante o teste entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA de uvas roxas orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \*\* $p < 0,01$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle.

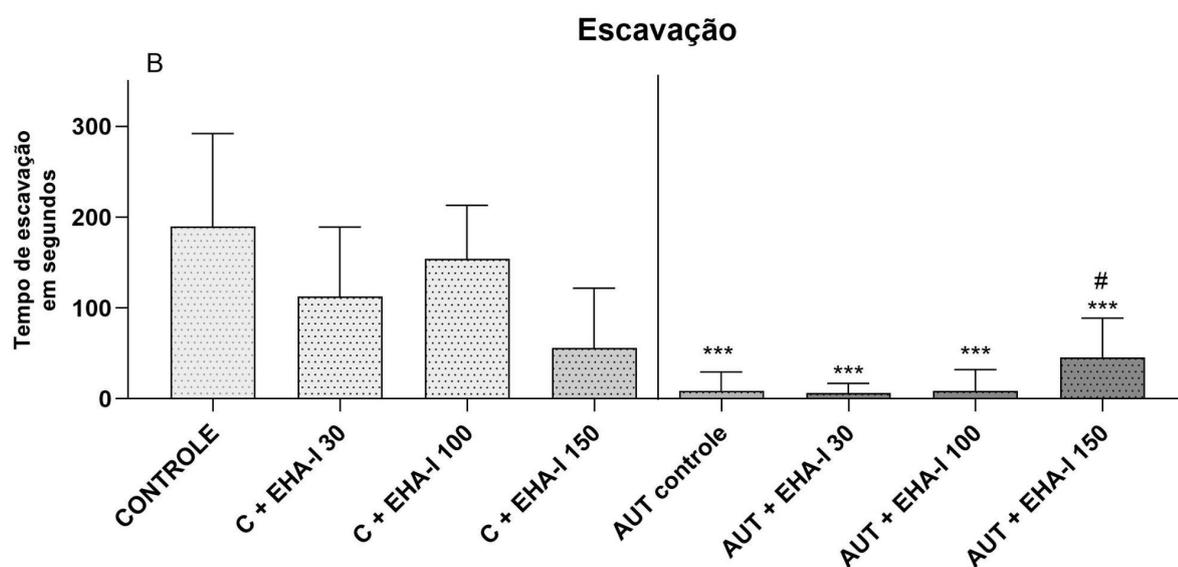


Gráfico 7B: Comparação do tempo de escavação total durante o teste entre os grupos controles e autistas e efeito da administração do EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle e \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre os grupos tratamento com EHA-I com o grupo AUT controle; # reversão parcial.

O tempo de olfato das substâncias testadas também foi analisado. O tempo de cheirar o extrato de baunilha foi significativamente maior no grupo controle quando comparado ao grupo AUT ( $p < 0,05$ ) (gráfico 8B e 9B). Além disso, em relação ao mesmo parâmetro, o EHA de uvas roxas orgânicas e o EHA-I de uvas roxas não orgânicas (gráficos 8B e 9B) na concentração de 100 e 150mg/kg causaram reversão parcial aumentando esse tempo, quando comparado ao grupo AUT ( $p < 0,001$ ). Quanto a comparação do tempo de cheirar a serragem, mesmo sendo um odor social, o grupo controle ainda apresentou um tempo maior quando comparado ao grupo AUT (gráfico 8A e 9A) ( $p < 0,001$ ), e os extratos tanto o EHA de uvas roxas orgânicas quanto o EHA-I de uvas roxas não orgânicas não mostraram diferença significativa nos grupos autistas em diferentes concentrações no odor social em relação ao controle ( $p > 0,05$ ). Ainda, quanto a comparação entre as substâncias analisadas, o grupo AUT teve um maior tempo de cheirar a serragem (odor social) do que o extrato de baunilha (odor não social) ( $p < 0,001$ ), mostrando uma tendência significativa a cheirar a serragem por um tempo maior entre os grupos autistas (gráficos 8 e 9).

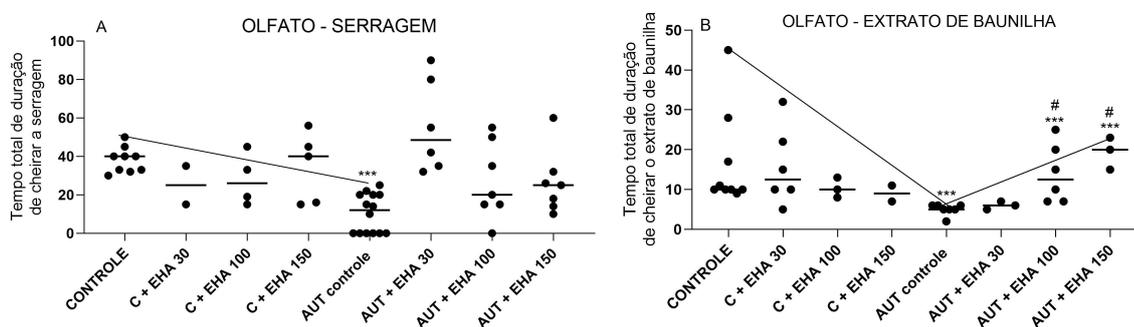


Gráfico 8A e 8B: Comparação do tempo de cheirar total entre o extrato de baunilha (odor não social) e serragem (odor social) durante o teste de olfato entre os grupos controles e autistas e a administração do EHA de uvas roxas orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle; # reversão parcial. ▲ potencialização do EHA.

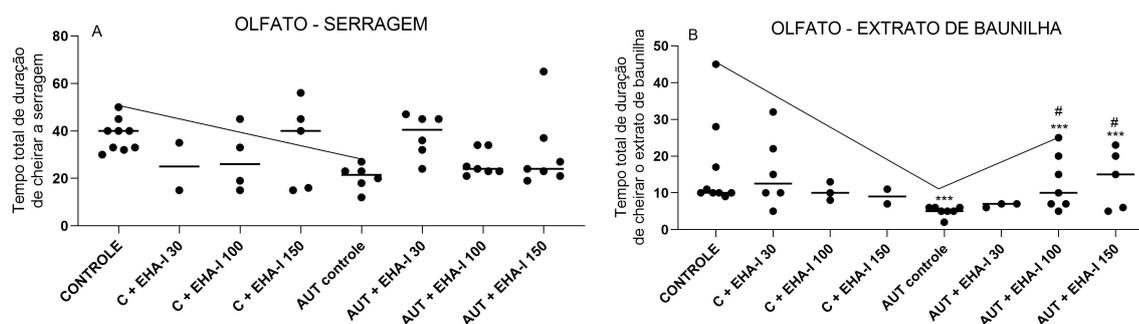


Gráfico 9A e 9B: Comparação do tempo de cheirar total entre o extrato de baunilha (odor não social) e serragem (odor social) durante o teste de olfato entre os grupos controles e autistas e a administração do EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150 mg/kg). \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ , comparação entre o grupo AUT controle com o grupo controle. # reversão parcial.

### 3.1.3 Efeitos do extrato hidroalcoólico (EHA) de uvas roxas orgânicas sobre parâmetros de estresse oxidativo em sangue de ratos.

Investigamos também o efeito do EHA de uvas roxas orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150mg/kg) sobre os níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e atividade de enzimas antioxidantes no sangue de ratos de 35 dias de idade. O gráfico 10 mostra que que o TEA aumentou os níveis de TBA-RS e o EHA na concentração de 100mg/kg e de 150mg/kg reverteu parcialmente o aumento em plasma de ratos (gráfico 10A) [ $F(7,44) = 28.934$ ;  $p < 0,001$ ]. O gráfico 10B mostra que o EHA na concentração de 150mg/kg *por si só* aumentou o conteúdo total de sulfidrilas no plasma de ratos [ $F(4,29) = 35.937$ ;  $p < 0,001$ ]. O modelo animal de autismo diminuiu a atividade da CAT e o EHA na concentração de 30mg/kg foi capaz de reverter parcialmente e nas concentrações de 100 e 150mg/kg reverteu totalmente a diminuição da atividade da CAT em eritrócitos de ratos com TEA (gráfico 10C) [ $F(7,44) = 5.033$ ;  $p < 0,001$ ]. Ainda, o gráfico 10D mostra que o TEA aumentou a atividade da SOD, enquanto o EHA na concentração de 100mg/kg reverteu parcialmente e na concentração de 150mg/kg reverteu totalmente o aumento da SOD nos eritrócitos [ $F(7,44) = 9.598$ ;  $p < 0,001$ ]. Também, na atividade da GSH-Px (gráfico. 10E), o EHA *por si só*, em todas as concentrações, aumentou a atividade dessa enzima. Além disso, o EHA em todas concentrações reverteu a diminuição desse parâmetro, quando comparado ao grupo autista, e na concentração de 150mg/kg

reverte e potencializou a atividade da GSH-Px nos eritrócitos de ratos [F(7,44)= 13.177; p<0,001].

Gráfico 10

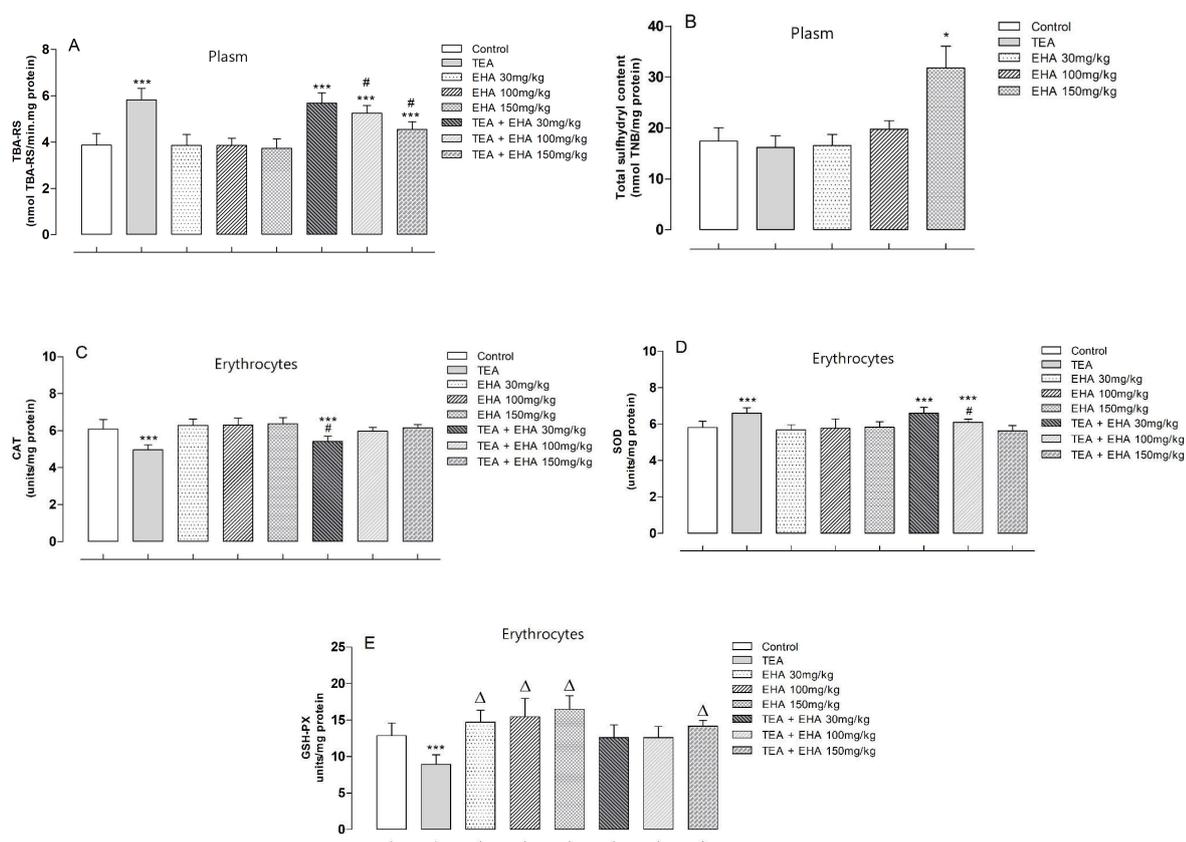
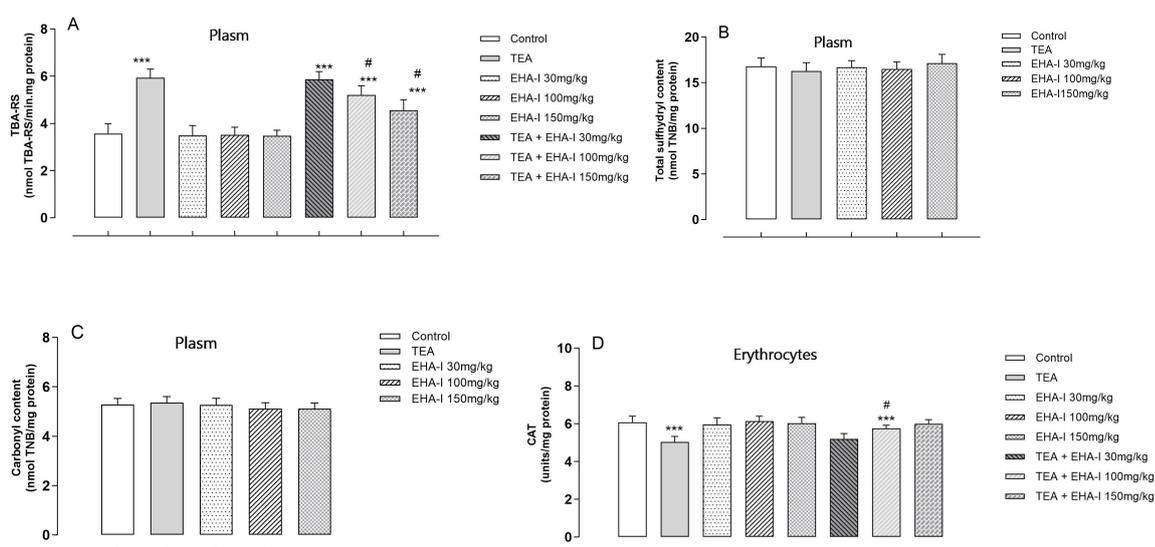


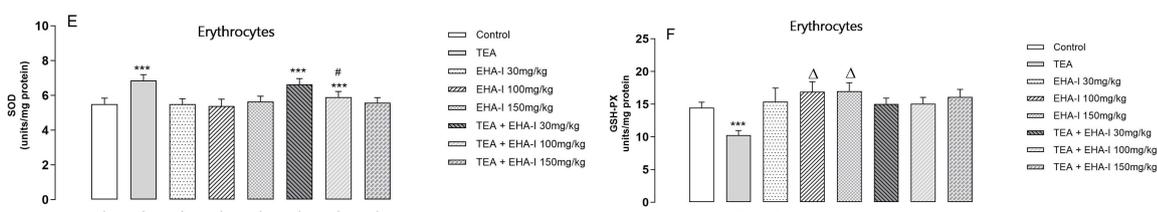
Gráfico 10. Influência do EHA de uvas roxas orgânicas (30mg/kg-150mg/kg) sobre TBA-RS (A), conteúdo total de sulfidrilas (B), e em enzimas antioxidantes CAT (C), SOD (D) e GSH-Px (E) em sangue de ratos induzidos com TEA. \*\*\*p<0,001 e \*p<0,05 grupo autista comparado com grupo controle (Duncan's multiple range test). # reversão parcial. ▲ potencialização do EHA.

## 2.8.4 Efeitos do EHA-I de uvas roxas não orgânicas sobre parâmetros de estresse oxidativo em sangue de ratos.

Investigamos também o efeito do EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações (30, 100 e 150mg/kg) sobre os níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas, conteúdo total de carbonilas e enzimas antioxidantes no sangue de ratos de 35 dias de idade. O gráfico 11A mostra que o EHA-I na concentração de 100mg/kg e de 150mg/kg reverteu parcialmente o aumento de TBA-RS em plasma de ratos (gráfico 11A) [F(7,48)=60.009;  $p < 0,001$ ]. Com relação ao conteúdo total de sulfidrilas (gráfico 11B) [F(4,30)=0.935;  $p > 0,05$ ] e conteúdo total de carbonilas (gráfico 11C) [F(4,30)= 1,395,  $p > 0,05$ ] não houve alteração significativa causada pelo TEA. Por outro lado, em relação à atividade da CAT (gráfico 11D) [F(7,48)=16.028;  $p < 0,001$ ] e da SOD (gráfico 11E) [F(7,48)=21.441;  $p < 0,001$ ], o EHA-I na concentração de 100mg/kg reverteu parcialmente e na concentração de 150mg/kg reverteu totalmente a diminuição da atividade da CAT, e o aumento da atividade da SOD em eritrócitos. Na atividade da GSH-Px (gráfico 11F), o EHA-I *por si só*, nas concentrações de 100mg/kg e 150mg/kg, aumentou a atividade dessa enzima. Além disso, o EHA-I em todas as concentrações reverteu a diminuição desse parâmetro, quando comparado ao grupo autista [F(7,48)=31.643;  $< 0,001$ ].

Gráfico 11





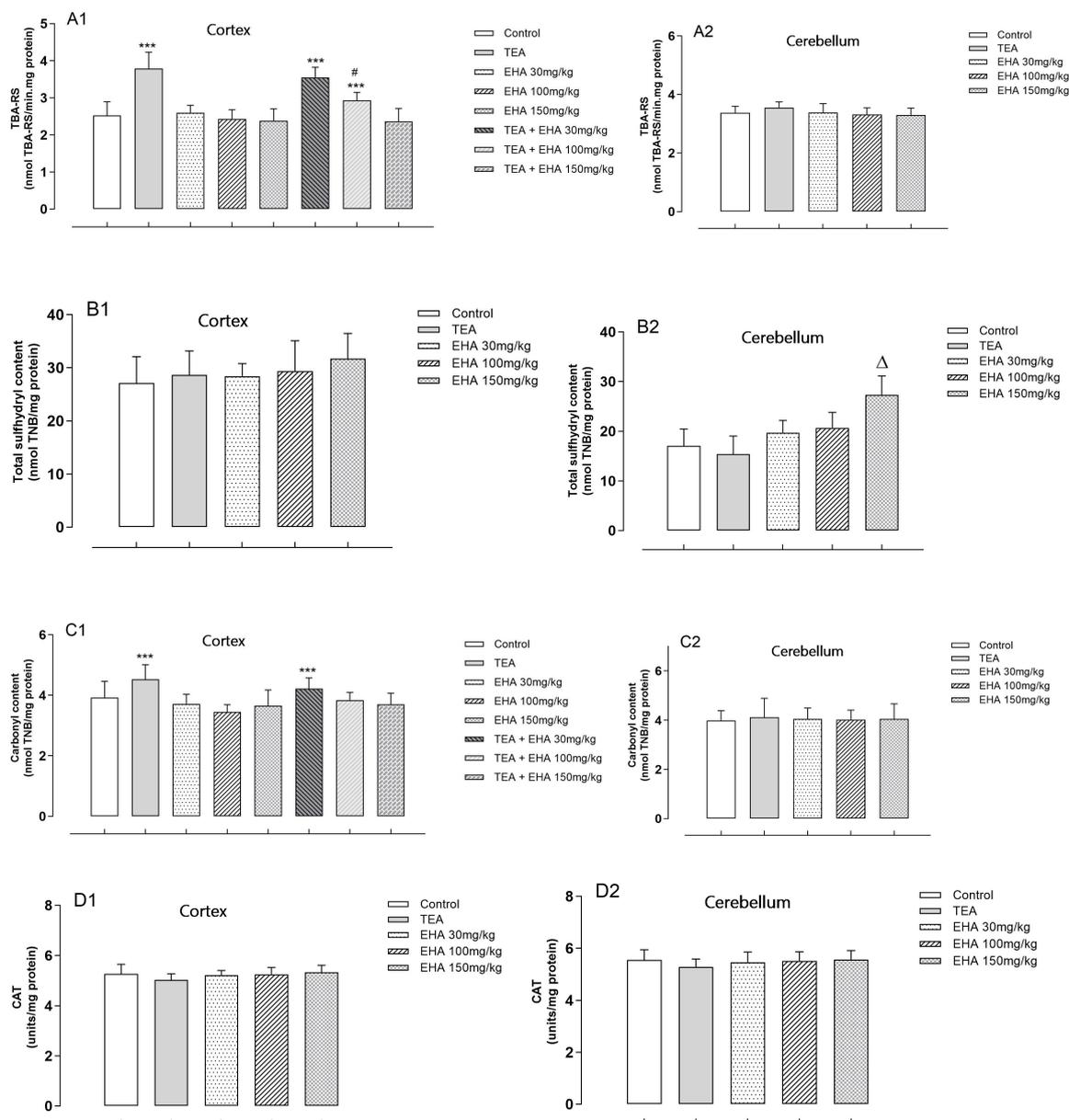
(EHA-I) (30mg/kg-150mg/kg) sobre TBA-RS (A), conteúdo total de sulfidrilas (B), conteúdo total de carbonilas (C) e na atividade das enzimas antioxidantes CAT (D), SOD (E) e GSH-Px (F) em sangue de ratos induzidos com TEA. \*\*\* $p < 0.001$ , grupo autista comparado com grupo controle (Duncan's multiple range test). # reversão parcial. ▲ potencialização do EHA-I.

### 2.8.5 Efeitos do EHA de uvas roxas orgânicas sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos.

Também investigamos o efeito do EHA de uvas roxas orgânicas (30, 100 e 150 mg/kg) sobre os parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos de 35 dias de idade. O gráfico 12A1 mostra que o TEA aumentou os níveis de TBA-RS e que o EHA na concentração de 100mg/kg reverteu parcialmente e na concentração de 150mg/kg reverteu o aumento dos níveis de TBA-RS em córtex cerebral [F (7,44)= 21.082;  $p < 0,001$ ], no entanto não alterou esse parâmetro no cerebelo de ratos (gráfico 12A2) [F(4,29)= 1260;  $p > 0,05$ ]. O gráfico 12C1 mostra que o TEA aumentou o conteúdo total de carbonilas e que o EHA (100mg/kg e 150mg/kg) reverteram essa alteração no córtex cerebral [F (7,44) = 4.858;  $p < 0,001$ ], enquanto no cerebelo (gráfico 12C2) [F(4,29)= 0.055;  $p > 0,05$ ] esse parâmetro não sofreu diferença significativa. No cerebelo, [F (4,29) = 12.366;  $p < 0,001$ ] o EHA na concentração de 150mg/kg, *por si só*, aumentou o conteúdo total de sulfidrilas (gráfico 12B2) [F(4,29)= 12.366;  $p < 0,001$ ], enquanto não houve diferença significativa no córtex cerebral (gráfico 12B1) [F(4,29)= 0.905;  $p > 0,05$ ]. Ainda, o gráfico 12E1 mostra que o TEA diminuiu a atividade da SOD, enquanto o EHA na concentração de 30mg/kg reverteu parcial e nas concentrações de 100mg/kg e de 150mg/kg reverteu total a diminuição enzimática no córtex cerebral (fig. 3E1) [F(7,44)=11.801;  $p < 0,001$ ], enquanto que no cerebelo (gráfico 12E2) [F(4,29)=1.450;  $p > 0,05$ ] não houve alteração desse parâmetro. O modelo de indução de autismo e a administração do EHA em diferentes concentrações não alterou a

atividade da CAT em córtex cerebral (gráfico 12D1) [F(4,29)= 1.184; p>0,05] e em cerebelo (gráfico 12D2) [F(4,29)=0.770; p>0,05] e a atividade da GSH-Px em córtex cerebral (gráfico 12F1) [F(4,29)= 2.108; p>0,05]. Por outro lado, a atividade da GSH-Px no cerebelo (gráfico 12F2) [F (7,44)=6.472; p<0,001] diminuiu no grupo de animais com TEA, e, ainda, o EHA na concentração de 30 mg/kg reverteu parcial e de 100mg/kg e de 150mg/kg reverteu total a diminuição enzimática em ratos com TEA.

Gráfico 12



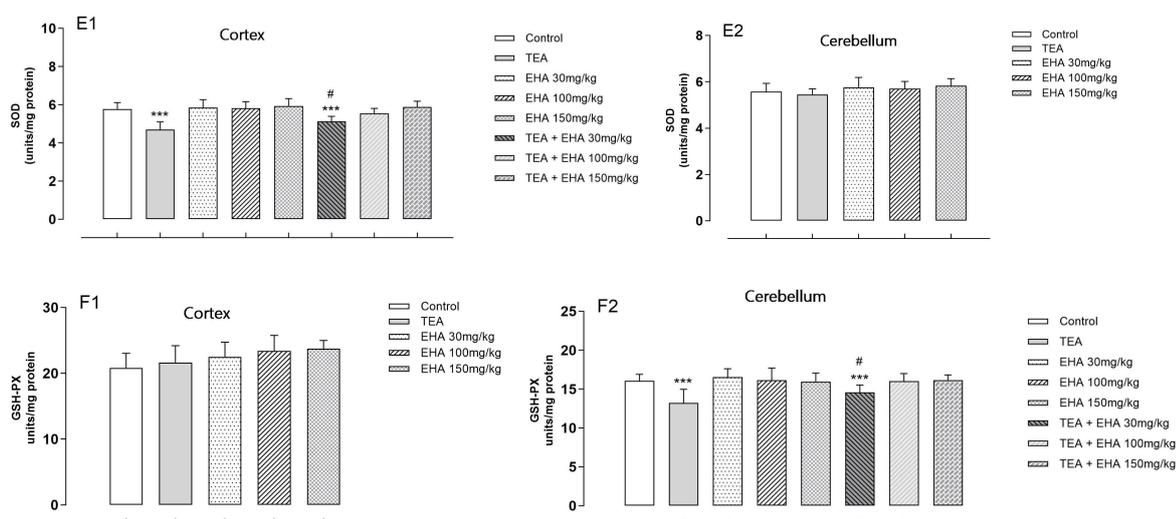


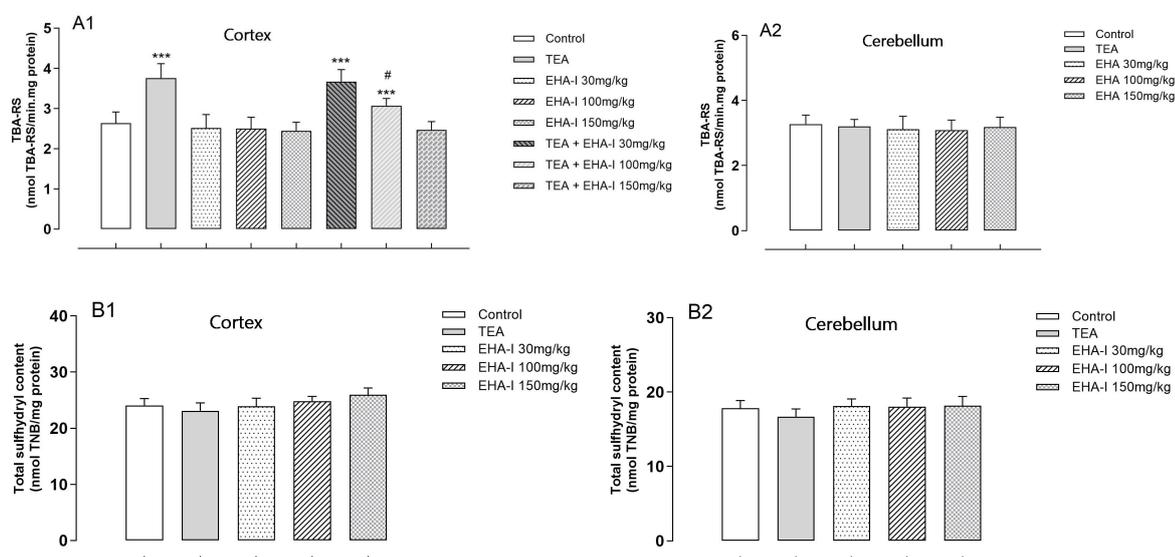
Gráfico 12 Influência do EHA de uvas roxas orgânicas (30mg/kg-150mg/kg) sobre TBA-RS (A1 e A2), conteúdo total de sulfidrilas (B1 e B2), conteúdo de carbonilas (C1 e C2), e em enzimas antioxidantes CAT (D1 e D2), SOD (E1 e E2) e GSH-Px (F1 e F2) em córtex cerebral e cerebelo de ratos induzidos com TEA. \*\*\* $p < 0.001$ , grupo autista comparado com grupo controle (Duncan's multiple range test). # reversão parcial. ▲ potencialização do EHA.

### 2.8.6 Efeitos do EHA-I de uvas roxas não orgânicas sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos.

Por fim, investigamos o efeito do EHA-I de uvas roxas não orgânicas (30, 100 e 150 mg/kg) sobre os parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos de 35 dias de idade. O gráfico 13A1 mostra que o TEA aumentou os níveis de TBA-RS e que o EHA-I na concentração de 100mg/kg reverteu parcialmente e na concentração de 150mg/kg reverteu o aumento dos níveis de TBA-RS em córtex cerebral [F(7,48)= 28.098;  $p < 0,001$ ], no entanto não alterou esse parâmetro no cerebelo de ratos (gráfico 13A2) [F(4,30)= 0.403;  $p > 0,05$ ]. O gráfico 13B1 e B2 mostra que não houve diferença significativa no conteúdo total de sulfidrilas tanto em córtex cerebral [F(4,30)= 5.214;  $p < 0,001$ ] quanto em cerebelo [F(4,30)= 2.230;  $p > 0,05$ ] de ratos. O gráfico 13C1 mostra que o TEA aumentou o conteúdo total de carbonilas e que o EHA-I na concentração de 100mg/kg reverteu parcialmente e na de 150mg/kg reverteu totalmente essa alteração no córtex cerebral [F(7,48)=27.512;  $p < 0,001$ ], enquanto no cerebelo (gráfico 13C2) [F(4,30)=0.668;  $p > 0,05$ ] esse parâmetro não sofreu diferença

significativa. Ainda, a administração do EHA-I em diferentes concentrações não alterou a atividade da CAT em córtex cerebral (gráfico 13D1) [F(4,30)= 0,408; p>0,05] e em cerebelo (gráfico 13D2) [F(4,30)=0.360; p>0,05]. Ainda, o gráfico 13E1 mostra que o TEA diminuiu a atividade da SOD, enquanto o EHA-I na concentração de 100mg/kg reverteu parcialmente e na concentração de 150mg/kg reverteu total a diminuição enzimática no córtex cerebral (gráfico 13E1) [F(7,48)=17.239; p<0,001], enquanto que no cerebelo (gráfico 13E2) [F(4,30)=0.134; p>0,05] não houve alteração desse parâmetro. O modelo de indução de autismo e a administração do EHA-I em diferentes concentrações não alterou a atividade da a GSH-Px em córtex cerebral (gráfico 13F1) [F(4,30)= 1,395; p>0,05]. Por outro lado, a atividade da GSH-Px no cerebelo (gráfico 13 F2) [F(7,48)= 15.736; p<0,001] diminuiu no grupo de animais com TEA, e, ainda, o EHA-I na concentração de 100mg/kg reverteu parcial e de 150mg/kg reverteu total a diminuição enzimática em ratos com TEA.

Gráfico 13



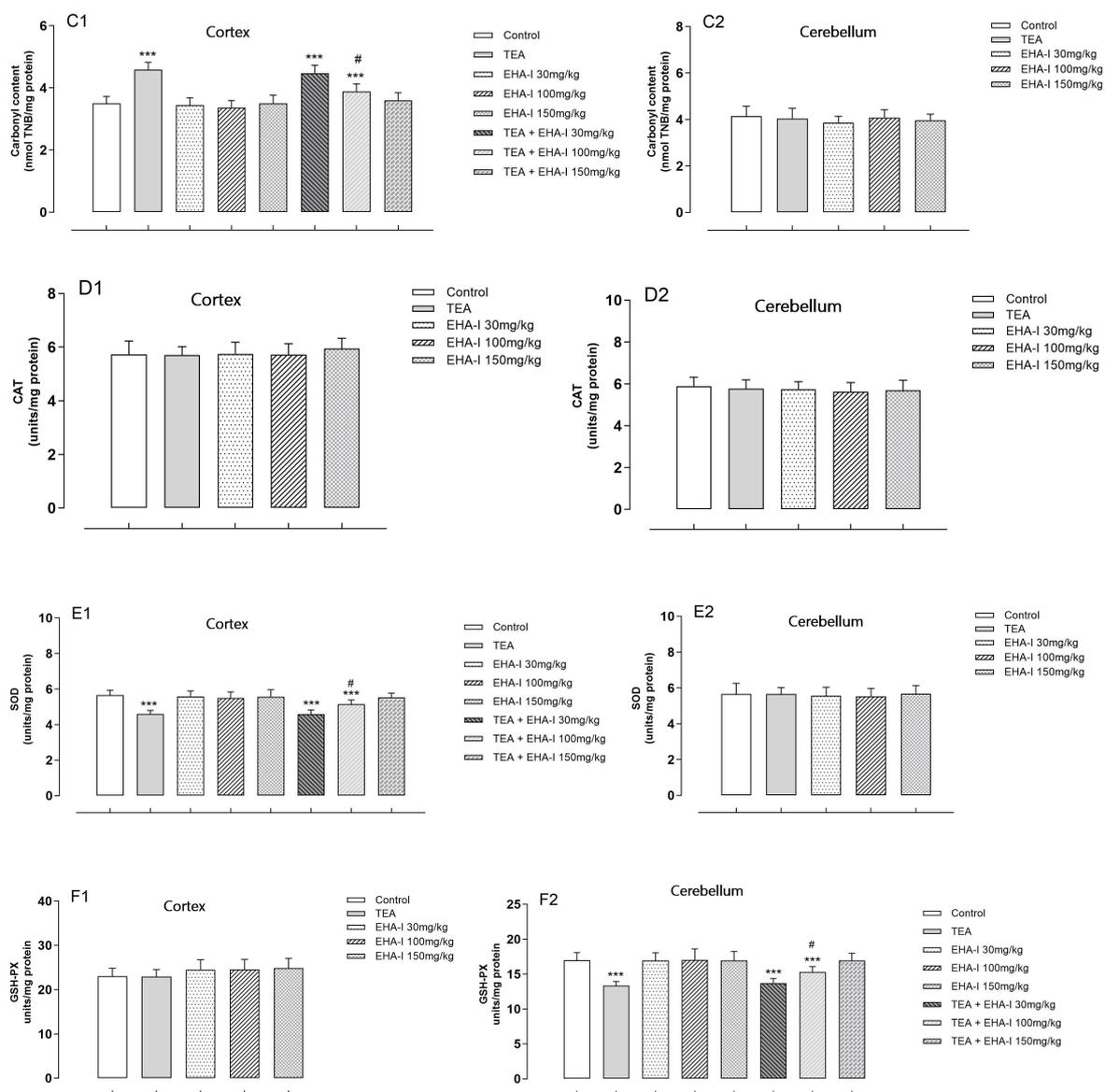


Gráfico 13 Influência do EHA-I de uvas roxas não orgânicas (30mg/kg-150mg/kg) sobre TBA-RS (A1 e A2), conteúdo total de sulfidrilas (B1 e B2), conteúdo de carbonilas (C1 e C2), e em enzimas antioxidantes CAT (D1 e D2), SOD (E1 e E2) e GSH-Px (F1 e F2) em córtex cerebral e cerebelo de ratos induzidos com TEA. \*\*\* $p < 0.001$ , grupo autista comparado com grupo controle (Duncan's multiple range test). # reversão parcial.

### 3. DISCUSSÃO

Atualmente, modelos de roedores baseados na exposição pré-natal são amplamente utilizados para estudar os mecanismos de causa, etiologia e danos neurológicos do TEA (Rodier *et al.*, 1996). Em relação ao modelo experimental de TEA induzido pela administração do AVP, foi possível comprovar a indução do TEA devido às alterações observadas nos testes comportamentais e no sistema antioxidante desses animais. Estudos anteriores de Schneider (2005), já demonstraram a indução do TEA em animais através da administração pré-natal de AVP, mostrando a comprovação do modelo autista (Schneider, T., Przewlocki, R., 2005).

Os testes de comportamento em modelos animais com variação fenotípica do comportamento social buscam replicar padrões comportamentais humanos em outros animais, com o objetivo de identificar os métodos mais eficazes de estimulação para melhorar a cognição social em humanos (Karvat e Kimchi, 2012). Em relação aos testes comportamentais, nesse estudo foi realizada a comparação entre os grupos através de parâmetros comportamentais como de autolimpeza, interação social, campo aberto, escavação e olfato.

No teste de autolimpeza, mensurou-se a quantidade de movimentos de autolimpeza e o tempo total de movimentação por 10 minutos. O comportamento de autolimpeza é natural, e articulado principalmente pelo estado de ansiedade do animal. Sua avaliação tem como objetivo verificar a presença de estereotipia e sua repetitividade, que é bastante frequente em modelos animais de TEA (Du *et al.*, 2017). No estudo foi possível evidenciar que os animais autistas apresentaram tempo significativamente maior de autolimpeza durante o período analisado, em relação ao grupo controle. Entre os grupos de animais tratados com EHA de uvas roxas orgânicas e EHA-I de uvas roxas não orgânicas em diferentes concentrações, o grupo autista tratado com EHA na concentração de 100 e 150mg/kg e com EHA-I na concentração de 150mg/kg mostraram tempo significativamente menor de movimentação que o grupo autismo controle, havendo uma diminuição do comportamento repetitivo, conforme o aumento da concentração de extrato. Esses achados tanto validam o modelo de autismo como sugerem que o EHA e o EHA-I promoveram melhora desse comportamento.

O comportamento repetitivo é um dos déficits dos três domínios para o diagnóstico de autismo (Lewis *et al.*, 2007). Já houve o estabelecimento da

importância dos gânglios da base na mediação do comportamento repetitivo em ratos, inclusive quando da injeção de agonistas da dopamina no corpo estriado. Entretanto, há uma grande quantidade de estudos sobre comportamento repetitivo e restrição ambiental ou privação social (Lutz *et al.*, 2003) salientando que o comportamento repetitivo no autismo é uma forma limitada de avaliar o diagnóstico, sugerindo que os indivíduos com autismo podem sofrer de déficits em vários domínios de funcionamento, incluindo social, emocional, motor e cognitivo (Pierce *et al.*, 2001).

No teste de interação social, na avaliação do tempo de interação com o animal, o grupo controle mostrou uma tendência em ter um maior tempo de interação quando comparado com o grupo autista. Na avaliação do tempo de interação com o objeto, o grupo autista apresentou um maior tempo com o objeto do que o grupo controle e o EHA e o EHA-I em todas as concentrações (30 - 150mg/kg) conseguiram reverter esse tempo quando comparado ao grupo controle.

Ainda, as dificuldades sociais estão entre as características mais notáveis vistas em crianças com menos de três anos de idade. Nesse aspecto, a capacidade de realizar atenção conjunta, que envolve coordenar a própria atenção entre uma pessoa e um objeto distante, possui peculiaridades nas crianças com TEA. Enquanto crianças típicas respondem à atenção conjunta por volta dos 12 meses e iniciam essa habilidade aos 14 meses, as crianças com TEA não o conseguem mesmo após os 15 meses de vida, o que as leva a serem investigadas para o transtorno (Sanchack, 2016).

No teste do campo aberto foram analisados múltiplos parâmetros: o tempo sem locomoção do animal, tempo despendido em autolimpeza, quantidade de vezes em que se apoia apenas em duas patas e quantidade total de deslocamento durante o período de 10 minutos. O grupo controle autismo apresentou um tempo significativamente menor de locomoção que o grupo controle, durante o período analisado. Além disso, os grupos autistas tratados com EHA e EHA-I, em todas as concentrações, mostraram-se significativamente com um tempo menor de locomoção que os em todos os grupos controles analisados, comprovando mais uma vez o modelo autista e indicando que animais autistas exploraram menos o local em relação aos controles, sendo baixa atividade locomotora um indicador de ansiedade no autismo, à semelhança do observado em outros estudos pré-clínicos de indução de TEA (Kalueff e Tuohimaa, 2005).

No teste de enterramento das esferas de vidro (escavação), foi analisado o tempo sem locomoção, o tempo que o animal permaneceu enterrado e a quantidade de esferas enterradas em um período de 3 minutos. Quando analisado o tempo sem locomoção, o grupo controle autismo teve diminuição significativa do tempo de locomoção em relação ao grupo controle, ou seja, ficaram mais imóveis quando comparados aos animais controles. Além disso, o grupo autismo que recebeu EHA na concentração de 150mg/kg teve reversão total desse parâmetro, enquanto o tratamento com o EHA-I, em todas as concentrações do extrato (30-150mg/kg), causou reversão parcial. Considerando ainda o teste de escavação e analisando a quantidade de esferas enterradas, pode-se observar que esse parâmetro foi significativamente menor no grupo autista quando comparado ao grupo controle, e a administração do EHA-I nos grupos autistas reverteu totalmente esse parâmetro em todas as concentrações usadas do extrato (30-150mg/kg). Assim, os achados mais importantes foram referentes aos grupos de animais autistas, que se locomoveram e escavaram significativamente menos do que os controles, novamente validando o modelo, por meio da reprodução da ansiedade identificada, posto que não houve interação com o elemento novo apresentado, as esferas de vidro.

O teste do olfato também foi analisado para comparar uma substância que caracterizava uma novidade social em relação à serragem com a qual o animal já tinha contato antes do teste. Os resultados mostraram que o tempo despendido cheirando o odor familiar (serragem) quando comparado ao odor não familiar (extrato de baunilha) foi significativamente maior entre os animais autistas, mostrando o interesse pelo fator social e desinteresse pela novidade no autismo. Mesmo com esse fato, o tempo de cheirar a serragem ainda foi maior no grupo controle do que no grupo autista controle, demonstrando ainda um isolamento social neste último grupo. Além disso, em relação ao mesmo parâmetro, após a administração do EHA de uva roxa orgânica na concentração de 150mg/kg no grupo autista, o tempo despendido em cheirar o extrato de baunilha aumentou significativamente em relação ao autista controle, evidenciando o benefício do extrato em melhorar o comportamento em relação à novidade social. Ainda, quanto a comparação entre as substâncias analisadas, o grupo autista teve um maior tempo de cheirar a serragem (odor social) do que o extrato de baunilha (odor não social), mostrando uma preferência do grupo autista pelo odor social, ou seja, ao que estão sensivelmente acostumados. A investigação social em roedores na atividade de cheirar é uma importante avaliação quando se considera a

parte social e não social, de modo que outros estudos também evidenciaram que os fatores sociais são atraentes para os animais, havendo aumento de comportamento de cheirar os odores sociais (Lin *et al.*, 2017).

A idade dos animais utilizados foi preconizada como jovem para atender aos objetivos da influência comportamental do TEA no cérebro. No entanto, devido a possibilidade durante essa fase da plasticidade neuronal, esse pode ter sido, em parte, recuperado das injúrias sofridas no período gestacional e pós-natal, podendo explicar por que muitos dos efeitos esperados não terem sido evidenciados no estudo, mas evidenciando mesmo assim as alterações comportamentais de interesses restritos e repetitivos (Rouillet *et al.*, 2013). Outro ponto a ser observado nesse estudo foi o tipo de teste utilizado, assim como proposto no estudo de Bronzuoli *et al.* (2018), não possibilitou a identificação de alterações comportamentais a nível longitudinal desde o período gestacional à idade adulta, para compreender necessariamente os efeitos do AVP a longo prazo e em diferentes fases do desenvolvimento, podendo assim obter-se mais características comportamentais do TEA.

O sistema enzimático compreende os recursos antioxidantes existentes no organismo formados por enzimas altamente eficazes: superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e por moléculas endógenas antioxidantes como glutatona (GSH) e cisteína (GODIC *et al.*, 2014). A presença de EROs no sangue e no cérebro sugere prejuízo na atividade neurofisiológica. No estudo de Bu *et al.* (2017) já foi observado aumento significativo de espécies reativas intracelulares de oxigênio, ERO mitocondrial e apoptose induzida pelo estresse oxidativo em células linfoblásticas de pacientes com TEA. Além disso, em estudos anteriores já foi observado o aumento do estresse oxidativo no cérebro de crianças com TEA (Rose *et al.*, 2012). Ghezzi *et al.* em 2013, mostrou que há a formação de proteínas carboniladas, peroxidação lipídica e acúmulo de substâncias tóxicas de radicais livres em crianças com TEA, sendo que o aumento desses marcadores está correlacionado a gravidade do transtorno.

A variedade de compostos fenólicos e a implicação em separá-los em orgânicos e não orgânicos foi preconizada no estudo por diversas pesquisas já referirem a diferença biológica dessas composições. Em sistemas de produção orgânica o uso de pesticidas sintéticos, hormônios de crescimento, antibióticos, técnicas modernas de engenharia, fertilizantes químicos e lodo de esgoto não são permitidos e o uso de insumos que não advém da fazenda são mínimos. Assim, são

permitidos apenas os materiais orgânicos provenientes de explorações agrícolas biológicas, substâncias naturais e os fertilizantes minerais com baixa solubilidade (Iglesias-Carres *et al.*, 2019).

Uvas (*Vitis* spp.) são uma das culturas frutíferas mais amplamente produzidas em todo o mundo. Os extratos de uva são antioxidantes naturais potentes, frequentemente utilizados para eliminar os radicais livres e aumentar a imunidade, possuindo alta quantidade de antioxidantes poderosos como proantocianidinas, catequinas, flavonoides, estilbenos, vitamina E, polifenóis e taninos (MOHAMED *et al.*, 2024). Origens botânicas e geográficas da uva influenciam significativamente a atividade antioxidante e a composição fenólica dos sucos da fruta. Nesse sentido, os sucos de uva orgânicos apresentam maiores teores de compostos bioativos em comparação aos sucos convencionais. Também, há evidências dos benefícios do consumo das uvas advindas de um sistema de cultivo orgânico em comparação às de sistemas de produção convencionais. Em modelos animais de obesidade e epilepsia foram obtidos melhores resultados para a saúde desses, quando utilizadas uvas orgânicas (Granato, *et al.*, 2016).

Nesse estudo, a implicação da atividade antioxidante da uva deve-se principalmente ao componente presente já utilizado em outros estudos como o resveratrol. O Resveratrol (3,5,4 ' trihidroxiestilbeno) é um polifenol presente em inúmeras espécies de plantas, especialmente na pele e nas sementes das uvas da espécie *Vitis vinífera* e *labrusca*. Estudos enfatizam os papéis protetores e terapêuticos do resveratrol em diversas patologias, destacando o anti-inflamatório, antioxidante e neuroprotetor (Berman *et al.*, 2017). Modelos animais com TEA já relataram o efeito preventivo do tratamento pré-natal com resveratrol, possuindo eficácia na prevenção de danos cerebrais como antioxidante, melhorando resultados clínicos na irritabilidade e outros sintomas associados ao TEA (Deckmann *et al.*, 2021).

Nesse estudo foram investigados os efeitos da administração do EHA (30, 100 e 150mg/kg), obtido das uvas roxas orgânicas e não orgânicas (EHA-I) da *Vitis labrusca*, sobre as alterações nos níveis de TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e de proteínas carboniladas e sobre atividade de enzimas antioxidantes em sangue, córtex cerebral e cerebelo de ratos. Em nosso estudo, considerando o extrato de uva roxa orgânica e não orgânica foi possível analisar 39 padrões de compostos fenólicos, e puderam ser identificados 3 compostos: o resveratrol, um estilbeno; a naringenina e o

eriodictiol, dois flavonoides da classe das flavanonas. Todos os três compostos foram identificados em ambos os extratos, mostrando que, em relação ao perfil de compostos analisados, não houve diferença entre as amostras. O consumo de uvas roxas orgânicas pode alterar a biodisponibilidade e a metabolização dos polifenóis da uva.

Em ratos, foi demonstrado que as diferenças na composição fenólica e não fenólica de uvas cultivadas em um sistema de cultivo orgânico, em relação àquelas cultivadas convencionalmente, resultaram em diferentes perfis cinéticos de metabólitos fenólicos séricos de uva. Por resultado, as uvas orgânicas tiveram seus compostos polifenólicos mais metabolizados no intestino delgado de ratos em comparação às não orgânicas, indicando uma maior biodisponibilidade e aproveitamento (Iglesias-Carres *et al.*, 2019).

Nossos resultados mostraram que o TEA aumentou de forma significativa os níveis de TBA-RS em sangue de ratos. E que tanto o EHA quanto o EHA-I, nas concentrações de 100 mg/kg e de 150 mg/kg causaram reversão parcial do aumento de TBA-RS. Níveis plasmáticos do conteúdo total de carbonilas já foram analisados em outros estudos e não mostraram diferença, quando comparados grupos controles e autistas (Ghezzeo *et al.*, 2013). No cérebro, o TEA aumentou os níveis de TBA-RS e o conteúdo total de carbonilas, e tanto o EHA quanto o EHA-I na concentração de 100mg/kg reverteram parcial e na concentração de 150mg/kg reverteram totalmente o aumento de TBA-RS e de carbonilas em córtex cerebral, enquanto no cerebelo esses parâmetros não sofreram diferença significativa. Em um estudo conduzido por Lin, 2022, animais tratados com AVP exibiram níveis significativamente mais baixos de TBA-RS em córtex cerebral quando comparados aos animais expostos ao AVP no ambiente uterino (LIN, 2022).

Com relação às enzimas antioxidantes, em sangue de ratos, os resultados mostraram que o modelo animal de autismo aumentou a atividade da SOD e diminuiu da CAT e da GSH-Px em eritrócitos. O EHA e o EHA-I na concentração de 100mg/kg reverteram parcial e de 150mg/kg reverteram total o aumento da SOD e a diminuição da CAT, diferentemente de estudos anteriores relatados em eritrócitos em que a atividade enzimática da SOD e da CAT não mostraram diferença significativa nos grupos (Ghezzeo *et al.*, 2013). No entanto, em pesquisa recente foram verificadas diferenças nas concentrações das enzimas SOD, GSH-Px e CAT em amostras de sangue de crianças com TEA, mostrando capacidade reduzida da neutralização de

radicais livres (Waligóra *et al.*, 2019). Com relação a atividade da GSH-Px, o TEA diminuiu a atividade dessa enzima, favorecendo o estresse oxidativo no meio intracelular. Ainda, o EHA e o EHA-I, em todas as concentrações, reverteram a diminuição desse parâmetro, quando comparado ao grupo autista, e o EHA na concentração de 150mg/kg reverteu e potencializou a atividade da GSH-Px nos eritrócitos de ratos, mostrando-se um potente antioxidante.

Ainda em relação às enzimas antioxidantes, em cérebro, o modelo de autismo diminuiu a atividade da SOD em córtex cerebral e GSH-Px no cerebelo, enquanto o EHA na concentração de 30mg/kg e o EHA-I na concentração de 100mg/kg reverteu parcial e o EHA nas concentrações de 100mg/kg e de 150mg/kg e o EHA-I na concentração de 150mg/kg reverteu total a diminuição enzimática desses parâmetros.

Dados presentes na literatura mostram que a atividade da SOD nos eritrócitos é maior em crianças com TEA, em comparação com os controles (JAIME *et al.*, 2010). Um nível aumentado de SOD é considerado um mecanismo compensatório para neutralizar o dano celular causado pelo estresse oxidativo cerebral. Além disso, a atividade da CAT é reduzida nos eritrócitos, em desacordo com a sua atividade plasmática, que permanece inalterada (PANGARAZZI *et al.*, 2020). A GSH-Px tem sido relatada como um biomarcador muito importante do estresse oxidativo no TEA. Faber e colaboradores, em 2019, demonstraram níveis elevados de GSH-Px no sangue de crianças com TEA quando comparados a grupos controles. Por outro lado, alguns estudos foram comparados em uma metanálise encontrando níveis reduzidos de GSH-Px em crianças com TEA (Chen *et al.*, 2021), demonstrando que tanto o aumento quanto a diminuição da enzima pode ser considerado fator importante na análise do estresse oxidativo.

Concluindo, o estudo reproduziu o modelo animal de autismo através da comprovação dos principais sinais do TEA, no isolamento social e na atividade de estereotipia, analisados nos testes comportamentais. Ambos os extratos, EHA e EHA-I de uvas roxas orgânicas e não orgânicas, apresentam propriedades antioxidantes, principalmente na concentração de 150mg/kg, capazes de reverter parte das alterações comportamentais. Ainda, os extratos reverteram o dano lipídico e proteico e mostraram atividade antioxidante sanguínea e cerebral em animais autistas, sendo a propriedade antioxidante devido principalmente à presença de compostos fenólicos encontrados nas uvas. Novos estudos com o EHA de uvas roxas se fazem necessário, visando a busca por fatores preventivos e/ou auxiliares no tratamento do TEA.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- 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, abr. 2001.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual de Diagnóstico e Estatística de Distúrbios Mentais DSM-V**. Porto Alegre, Artmed, 2014.
- ANDRADE, S.; RAMALHO, M. J.; PEREIRA, M. D. C.; LOUREIRO, J. A. Resveratrol Brain Delivery for Neurological Disorders Prevention and Treatment. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, n. 1261, nov. 2018.
- AVRAHAM, Y.; KATZHENDLER, J.; VOROBIEV, L.; MERCHAVIA, S.; LISTMAN, C.; KUNKES, E.; HARFOUSH, F.; SALAMEH, S.; EZRA, A.F.; GRIGORIADIS, N.C.; BERRY, E.M.; NAJAJREH, Y. Novel acylethanolamide derivatives that modulate body weight through enhancement of hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) and/or decreased neuropeptide Y (NPY). **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n.5, p. 1811–1829, mar. 2013.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista De Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BERMAN, A. Y.; MOTECHIN, R. A.; WIESENFELD, M. Y.; HOLZ, M. K. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **NPJ precision oncology**, v. 1, n. 35, set. 2017.
- BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; TRINDADE, M. O. Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: **Revista Neurociências**, v. 20, n. 1, p. 117–127, mar. 2001.
- Bronzuoli, M.R.; Facchinetti, R.; Ingrassia, D., Sarvadio, M.; Schiavi, S., Steardo, L.; Verkhatsky, A.; Trezza, V.; Scuderi, C. Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. **Mol Autism**, v. 9, p.66, dec.2018.
- Bu, X.; Wu, D.; Lu, X.; et al. Role of SIRT1/PGC-1 $\alpha$  in mitochondrial oxidative stress in autistic spectrum disorder. **Neuropsychiatr Dis Treat**. v. 13, p. 1633-1645, jun 2017.
- CLARD, D. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **The National Academies Press (US)**, Washington, DC, ed. 8, 1996.
- CHEN, L.; SHI, X-J.; LIU, H., MAO, X., GUI, L-N., WANG, H., CHENG, Y. Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (N = 9109). **Translational Psychiatry**, v.11, n. 15, jan. 2021.

DECKMANN, I.; SANTOS-TERRA, J.; FONTES-DUTRA, M.; KÖRBES-ROCKENBACH, M.; BAUER-NEGRINI, G.; SCHWINGEL, G. B.; RIESGO R.; BAMBINI-JUNIOR, V.; GOTTFRIED, C. Resveratrol prevents brain edema, blood–brain barrier permeability, and altered aquaporin profile in autism animal model. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 81, n. 7, p. 579–604, nov. 2021.

DIETERT, R. R.; DIETERT, J. M.; DEWITT, J. C. Environmental risk factors for autism. **Emerging Health Threats Journal**, v.4, n. 1, 2011.

DU, L.; ZHAO, G.; DUAN, Z.; LI, F. Behavioral improvements in a valproic acid rat model of autism following vitamin D supplementation. **Psychiatry Research**, v. 253, p. 28-32, 2017.

ERNST. A. M; SMELIK, P.G. Site of action of dopamine and apomorphine on compulsive gnawing behaviour in rats. **Experientia**. v. 22, n.12, p. 837-838, 1966.

FABER, S.; FAHRENHOLZ, T.; WOLLE, M. M.; KERN, J.C.; PAMUKU, M.; MILLER L; JAMROM, Jeremiah; KINGSTON, H. M. S. Chronic exposure to xenobiotic pollution leads to significantly higher total glutathione and lower reduced to oxidized glutathione ratio in red blood cells of children with autism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 134, p. 666-677, abr. 2019.

FRANSEN, J. R.; NARAYANASAMY, P.; Neuroprotection through flavonoid: enhancement of the glyoxalase pathway. **Redox Biology**, v. 14, p. 465-473, abr. 2018.

Factors Associated with Autism Spectrum Disorder: Evidence-Based Principles and Recommendations. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 2, p. 217, fev. 2019.

GHEZZO A.; VISCONTI, P.; ABRUZZO, P.M; BOLOTTA A.; FERRERI, C. GOBBI, G.; MALISARDI, G.; MANFREDINI, S.;MARINI, M.;NANETTI, L.; PIPITONE, E.; RAFAELLI, F.; RESCA, F.; VIGNINI, A.; MAZZANTI, L. Oxidative stress and erythrocyte membrane alterations in children with autism: correlation with clinical features. **PLoS onevol**, v. 8, n.6, jun. 2013.

GIALLORETI, L. E.; MAZZONE, L.; BENVENUTO, A.; FASANO, A.; ALCON, A. G.; KRANEVELD, A.; MOAVERO, R., RAZ, R.; RICCIO, M. P.; SIRACUSANO, M.; ZACHOR, D. A.; MARINI, M.; CURATOLO, P. Risk and Protective Environmental

GRANATO, D.; MARGRAF, T.; BROTZAKIS, I.; CAPUANO, E.; VAN RUTH, S. M. Characterization of Conventional, Biodynamic, and Organic Purple Grape Juices by Chemical Markers, Antioxidant Capacity, and Instrumental Taste Profile. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 1, p. C55–C65, jan. 2015

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, Washington, v. 18, p. 385-403, 1934.

HARDEN, C.L. In utero valproate exposure and autism: long suspected, finally proven. **Epilepsy Curr**. v.13, p. 282–284, 2013.

HENDREN, R.L.; JAMES, S.J.; WIDJAJA, F.; LAWTON, B.; ROSENBLATT, A.; BENT, S. Randomized, placebo-controlled trial of methyl B12 for children with autism. **J Child Adolesc Psychopharmacol**, v. 26, p. 774-783, 2016.

JAMES, S.J.; Melnyk, S.; Jernigan, S.; Pavliv, O.; Trusty, T.; Lehman, S.; Seidel, L.; Gaylor, D.W.; Cleves, M.A. A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism. **Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet**, v. 153, p. 1209–1220, jan 2010.

KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **J Neurosci Methods**, v. 143, n.2, p. 169-177, abr. 2005.

KARVAT, G.; KIMCHI, T. Systematic autistic-like behavioral phenotyping of 4 mouse strains using a novel wheel-running assay. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 405–414, ago. 2012.

LEWIS, M. H.; TANIMURA, Y.; LEE, L.W.; BODFISH, J. W. Animal models of restricted repetitive behavior in autism. **Behav Brain Res**. v. 176, n. 1, p. 66-74, jan. 2007.

LIMA, A. B.; DELWING-DE LIMA, D.; VIEIRA, M. R.; POLETO, M. Z.; DELWING-DAL MAGRO, D.; BARAUNA, S. C.; ALBERTON, M. D.; PEREIRA, E. M.; PEREIRA, N. R.; SALAMAIA, E. M.; SIEBERT, D. A. Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 96, p. 642–649, dez. 2017.

LIN, J.; WANG, L.; GUO, .; SHI L.; ZHANG, K.; TANG, M.; HU,S.; DONG, S.; LIU, Y. Targeted sequencing and functional analysis reveal brain-size-related genes and their networks in autism spectrum disorders. **Mol Psychiatry**. p 1282-1290, set. 2017.

LORD, C.; ELSABBAGH, M.; BAIRD, G.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Autism spectrum disorder. **Lancet**, Londres, v. 392, p. 508–520, ago. 2018.

LOWRY, O. H. *et al.* PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LUTZ, C.; WELL, A.; NOVAK, M. Stereotypic and self-injurious behavior in rhesus macaques: a survey and retrospective analysis of environment and early experience. **Am J Primatol**, v. 60, n.1, p. 1-15, 2003.

Marco, E.M.; Llorente, R.; López-Gallardo, M., et al. The maternal deprivation animal model revisited. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 51, p. 151-163, 2015.

MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; RODRÍGUEZ-MORATÓ, J.; BORONAT, A.; DE LA TORRE, R. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. **Antioxidants**, Basileia, v. 6, n. 4, p. 73, 2017.

MATSON, J. L.; GOLDIN, R. L. Diagnosing young children with autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 44–48, dez. 2014.

MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; DENNY, C.; DOS SANTOS, L. F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G. E.; VIEIRA, T. M.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act

as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160–169, ago. 2015

MOKNI, M.; ELKAHOUI, S.; LIMAM, F.; AMRI, M.; AOUANI E. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochem Res.**, v. 32, n. 6, p. 981-987, jun. 2007.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; DOS SANTOS, D. B.; ANTUNES, A.; DAUFENBACH, J. F.; MANOSSO, L. M.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Protective Effects of Ascorbic Acid on Behavior and Oxidative Status of Restraint-Stressed Mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 49, n. 1, p. 68–79, jan. 2013.

NUNES, G. D. F. Modelo Animal de Autismo por Exposição Pré-Natal ao Ácido Valpróico: Análise de Sinapses Excitatórias e Inibitórias. **Tese (mestrado em neurociências)– Instituto de ciências básicas da saúde**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.4, 2015.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

ORNOY, A.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ERGAZ, Z; Prevention or amelioration of autism-like symptoms in animal models: will it bring Us closer to treating human ASD? **Int J Mol Sci**, v. 20, n.5, mar. 2019.

PANGRAZZI, L.; BALASCO, L.; BOZZI, Y; Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. **Int. J. Mol. Sci.** 2020, 21, 3293.

PIERCE, K.; COURCHESNE, E.; Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 8, p. 655–664, abr. 2001.

RAPIN, I. The Autistic-Spectrum Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 302–303, ago. 2002.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. [38] Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357–363, 1994.

RODIER, P. M.; INGRAM, J. L.; TISDALE, B.; NELSON, S.; ROMANO, J. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 370, n. 2, p. 247–261, jun. 1996.

ROSE, S.; MELNYK, S.; PAVLIV, O.; BAI, S.; NICK, T. G.; FRYE, R. E.; JAMES, S. J. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 7, p. e134–e134, jul. 2012.

ROULLET, F. I.; Lai, J. K. Y.; FOSTER, J. A. In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 36, p. 47-56, 2013.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**. v. 30, p. 80-89, 2005.

SCOTT, D. F.; The history of epileptic therapy: an account of how medication was developed. **Carnforth u.a.: Parthenon Publ. Group**, ed. 1, p. 131, fev. 1993.

STACK, C. M.; LIM, M. A.; CUASAY, K.; STONE, M. M.; SEIBERT, K. M.; SPIVAK-POHIS, I.; CRAWLEY, J. N.; WASCHEK, J. A.; HILL, J. M. Deficits in social behavior and reversal learning are more prevalent in male offspring of VIP deficient female mice. **Exp Neurol**. v. 211, n.1, p. 67-84, 2008.

TANG, B. L. Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1—A hypothesis. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 4–5, p. 359–361, mar. 2010.

THOMAS, M.S.; ANNAZ, D.; ANSARI, D.; SCERIF, G.; JARROLD, C.; KARMILOFF-SMITH, A. Using developmental trajectories to understand developmental disorders. **J Speech Lang Hear Res**. v. 52, p. 336–358, 2009.

WENDEL, A. [44] Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

XIE, W.; GE, X.; LI, L.; YAO, A.; WANG, X.; LI, M.; GONG, X.; CHU, Z.; LU, Z.; HUANG, X.; JIAO, Y.; WANG, Y.; XIAO, M.; CHEN, H.; XIANG, W.; YAO, P. Resveratrol ameliorates prenatal progesterin exposure-induced autism-like behavior through ER $\beta$  activation. **Mol. Autism**, v. 9, n.1, 2018.

CATALAO, C. H. R.; SANTOS-JUNIOR, N. N.; DA COSTA ; L. H. A.; SOUZA, A. O. *et al.* Brain Oxidative Stress During Experimental Sepsis Is Attenuated by Simvastatin Administration. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 9, p. 7008-7018, nov. 2017.

SANCHACK, K. E.; THOMAS, C. A. Autism Spectrum Disorder: Primary Care Principles. **American family physician**, v. 94, n. 12, p. 972–979, dez. 2016.

## 7. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- 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, abr. 2001.
- ALMANDIL, N. *et al.* Environmental and Genetic Factors in Autism Spectrum Disorders: Special Emphasis on Data from Arabian Studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 4, p. 658, fev. 2019.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV ; includes ICD-9-CM codes effective**. Washington, v. 4, n. 7, Out. 1996.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual de Diagnóstico e Estatística de Distúrbios Mentais DSM-V**. Porto Alegre, Artmed, 2014.
- ANAGNOSTOPOULOU, M. A. *et al.* Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 19–25, jan. 2006.
- ANTONELLI, M. C. *et al.* Long-term consequences of prenatal stress and neurotoxicants exposure on neurodevelopment. **Progress in Neurobiology**, v. 155, p. 21–35, ago. 2017.
- ANDRADE, S.; RAMALHO, M. J.; PEREIRA, M. D. C.; LOUREIRO, J. A. Resveratrol Brain Delivery for Neurological Disorders Prevention and Treatment. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, n. 1261, nov. 2018.
- AVRAHAM, Y.; KATZHENDLER, J.; VOROBIEV, L.; MERCHAVIA, S.; LISTMAN, C.; KUNKES, E.; HARFOUSH, F.; SALAMEH, S.; EZRA, A.F.; GRIGORIADIS, N.C.; BERRY, E.M.; NAJAJREH, Y. Novel acylethanolamide derivatives that modulate body weight through enhancement of hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) and/or decreased neuropeptide Y (NPY). **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n.5, p. 1811–1829, mar. 2013.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista De Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.
- BERMAN, A. Y.; MOTECHIN, R. A.; WIESENFELD, M. Y.; HOLZ, M. K. The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **NPJ precision oncology**, v. 1, n. 35, set. 2017.
- BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; TRINDADE, M. O. Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: **Revista Neurociências**, v. 20, n. 1, p. 117–127, mar. 2001.
- Berridge, K. C., Aldridge, J. W., Houchard, K. R., & Zhuang, X. (2005). Sequential super- stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. **BMC Biology**, 3(4).

BHANDARI, R.; KUHAD, A. Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. **Neurochemistry International**, v. 103, p. 8–23, fev. 2017.

BRAUN, J. M. *et al.* Gestational Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals and Reciprocal Social, Repetitive, and Stereotypic Behaviors in 4- and 5-Year-Old Children: The HOME Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 5, p. 513–520, maio 2014.

BURNS, T. C.; VERFAILLIE, C. M.; LOW, W. C. Stem cells for ischemic brain injury: A critical review. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 515, n. 1, p. 125–144, jul. 2009.

CA BOSA, M. T. **Autismo: avaliação psicológica e neuropsicológica**. [s.l.: s.n.].

CHAN, K.-M.; DELFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 375–380, set. 1986.

CHRISTENSEN, J. *et al.* Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. **JAMA**, v. 309, n. 16, p. 1696, abr. 2013a.

CHRISTENSEN, J. *et al.* Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. **JAMA**, v. 309, n. 16, p. 1696, abr. 2013b. CLARD, D. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. **The National Academies Press (US)**, Washington, DC, ed. 8, 1996.

CHEN, L.; SHI, X.-J.; LIU, H., MAO, X., GUI, L.-N., WANG, H., CHENG, Y. Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (N = 9109). **Translational Psychiatry**, v.11, n. 15, jan. 2021.

COGHLAN, S. *et al.* GABA system dysfunction in autism and related disorders: From synapse to symptoms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 9, p. 2044–2055, out. 2012.

DECKMANN, I.; SANTOS-TERRA, J.; FONTES-DUTRA, M.; KÖRBES-ROCKENBACH, M.; BAUER-NEGRINI, G.; SCHWINGEL, G. B.; RIESGO R.; BAMBINI-JUNIOR, V.; GOTTFRIED, C. Resveratrol prevents brain edema, blood–brain barrier permeability, and altered aquaporin profile in autism animal model. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 81, n. 7, p. 579–604, nov. 2021.

DELWING, D. *et al.* α-Tocopherol and Ascorbic Acid Administration Prevents the Impairment of Brain Energy Metabolism of Hyperargininemic Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 2, p. 177–189, mar. 2006.

DIETERT, R. R.; DIETERT, J. M.; DEWITT, J. C. Environmental risk factors for autism. **Emerging Health Threats Journal**, v.4, n. 1, 2011.

DE FELICE, A.; SCATTONI, M. L.; RICCI, L.; CALAMANDREI, G. Prenatal Exposure to a Common Organophosphate Insecticide Delays Motor Development in a Mouse Model of Idiopathic Autism. **PLoS ONE**. v. 10, n. 3, 2015.

DU, L.; ZHAO, G.; DUAN, Z.; LI, F. Behavioral improvements in a valproic acid rat model of autism following vitamin D supplementation. **Psychiatry Research**, v. 253, p. 28-32, 2017.

EMBERTI GIALLORETI, L. *et al.* Risk and Protective Environmental Factors Associated with Autism Spectrum Disorder: Evidence-Based Principles and Recommendations. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 2, p. 217, fev. 2019.

ESBENSEN, A. J. *et al.* A Longitudinal Investigation of Psychotropic and Non-Psychotropic Medication Use Among Adolescents and Adults with Autism Spectrum Disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 39, n. 9, p. 1339–1349, set. 2009.

ESTERBAUER, H.; ZOLLERN, H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, n. 2, p. 197–203, jan. 1989.

GETZ, K. D. *et al.* Maternal Pre-pregnancy Body Mass Index and Autism Spectrum Disorder among Offspring: A Population-Based Case-Control Study. **Pediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 30, n. 5, p. 479–487, set. 2016.

GHANIZADEH, A.; SAHRAEIZADEH, A.; BERK, M. A Head-to-Head Comparison of Aripiprazole and Risperidone for Safety and Treating Autistic Disorders, a Randomized Double Blind Clinical Trial. **Child Psychiatry & Human Development**, v. 45, n. 2, p. 185–192, abr. 2014.

GODIC, A. *et al.* The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–6, mar. 2014.

GOMES, P. T. M. *et al.* Autism in Brazil: a systematic review of family challenges and coping strategies. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 2, p. 111–121, mar. 2015.

GONZÁLEZ-FRAGUELA, M. Oxidative Stress Markers in Children with Autism Spectrum Disorders. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 3, n. 2, p. 307–317, jan. 2013.

GOODNICK, P. J.; JERRY, J. M. Aripiprazole: profile on efficacy and safety. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 3, n. 12, p. 1773–1781, dez. 2002.

GOODRICH, A. J. *et al.* Joint effects of prenatal air pollutant exposure and maternal folic acid supplementation on risk of autism spectrum disorder: Prenatal folic acid, air pollution, and ASD. **Autism Research**, v. 11, n. 1, p. 69–80, jan. 2018.

GRANATO, D. *et al.* Characterization of Conventional, Biodynamic, and Organic Purple Grape Juices by Chemical Markers, Antioxidant Capacity, and Instrumental Taste Profile: Quality of purple grape juices.... **Journal of Food Science**, v. 80, n. 1, p. C55–C65, jan. 2015.

GRANATO, D. *et al.* Effects of geographical origin, varietal and farming system on the chemical composition and functional properties of purple grape juices: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 31-48, 2016.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. **Journal of Comparative Psychology**. Washington, v. 18, p. 385-403, 1934.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, jun. 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Nova Iorque: OUP Oxford., 2007.

HALLMAYER, J. *et al.* Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism. **Archives of General Psychiatry**, v. 68, n. 11, p. 1095, nov. 2011.

HARA Y.; MAEDA Y.; KATAOKA S.; AGO Y.; TAKUMA K.; MATSUDA T. Effect of prenatal valproic acid exposure on cortical morphology in female mice. **J Pharmacol Sci**, v. 118, n.4, p.543-546, 2012.

HARDEN, C. L. In utero valproate exposure and autism: long suspected, finally proven. **Epilepsy Curr**. v. 13, n. 6, p. 282–284, 2013.

HAYES, J. *et al.* Clinical practice guidelines for diagnosis of autism spectrum disorder in adults and children in the UK: a narrative review. **BMC Psychiatry**, v. 18, n. 1, p. 222, dez. 2018.

HOWES, O. D. *et al.* Autism spectrum disorder: Consensus guidelines on assessment, treatment and research from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 32, n. 1, p. 3–29, jan. 2018.

IDRING, S. *et al.* Parental age and the risk of autism spectrum disorders: findings from a Swedish population-based cohort. **International Journal of Epidemiology**, v. 43, n. 1, p. 107–115, fev. 2014.

IGLESIAS-CARRES, L.; MAS-CAPDEVILA, A.; BRAVO, F. I.; ARAGONÈS, G.; AROLA-ARNAL, A.; MUGUERZA, B. A comparative study on the bioavailability of phenolic compounds from organic and nonorganic red grapes. **Food chemistry**, v. 299, nov. 2019.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 285–290, maio 2001.

JESNER, O. S.; AREF-ADIB, M.; COREN, E. Risperidone for autism spectrum disorder. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2010, n. 1, jan. 2007.

JESTE, S. S.; TUCHMAN, R. Autism Spectrum Disorder and Epilepsy: Two Sides of the Same Coin? **Journal of Child Neurology**, v. 30, n. 14, p. 1963–1971, dez. 2015.

KARIMI, P. *et al.* Environmental factors influencing the risk of autism. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 27, 2017.

KARVAT, G.; KIMCHI, T. Systematic autistic-like behavioral phenotyping of 4 mouse strains using a novel wheel-running assay. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 405–414, ago. 2012a.

KARVAT, G.; KIMCHI, T. Systematic autistic-like behavioral phenotyping of 4 mouse strains using a novel wheel-running assay. **Behavioural Brain Research**, v. 233, n. 2, p. 405–414, ago. 2012b.

KIM, D. *et al.* The joint effect of air pollution exposure and copy number variation on risk for autism: Genetic and environment interaction in autism. **Autism Research**, v. 10, n. 9, p. 1470–1480, set. 2017.

KIM, K. C.; KIM, P.; GO, H. S.; CHOI, C. S.; PARK, J. H.; KIM, H. J.; JEON, S. J.; DELA PENA, I. C.; HAN, S. H.; CHEONG, J. H. *et al.* Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. **J. Neurochem.** v. 124, p. 832–843, 2013.

KIM, K. C.; KIM P.; GO, H. S.; CHOI, C. S.; YANG, S. I.; CHEONG, J. H. *et al.* The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. **Toxicol Lett**, v. 201, n. 2, p. 137-142, 2011.

KIM, P.; PARK, J. H.; KWON, K. J.; KIM, K. C.; KIM, H. J.; LEE, J. M. *et al.* Effects of Korean red ginseng extracts on neural tube defects and impairment of social interaction induced by prenatal exposure to valproic acid. **Food Chem Toxicol.** v. 51, p. 288-296, 2012.

LAI, M.-C.; LOMBARDO, M. V.; BARON-COHEN, S. Autism. **The Lancet**, v. 383, n. 9920, p. 896–910, mar. 2014.

LAM, J. *et al.* A Systematic Review and Meta-Analysis of Multiple Airborne Pollutants and Autism Spectrum Disorder. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0161851, set. 2016.

LEARY S.; UNDERWOOD W.; ANTHONY R.; CARTNER S.; COREY D.; GREENACRE C. *et al.* **AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals**. 13. ed. Schaumburg, 2013.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed., Artmed, 2014.

LIMA, A. B. *et al.* Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 642–649, dez. 2017.

LIN, J. **O transtorno do espectro autista como um sintoma e não um diagnóstico: considerações clínicas e pré-clínicas em busca da compreensão do autismo**. Orientadora: Cinara Ludvig Gonçalves. 2022. Tese de doutorado (Pós-graduação em Ciências da Saúde) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2022.

LOCK, J.; LA VIA, M. C. Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents With Eating Disorders. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 412–425, maio 2015.

LOWRY, O. H. *et al.* PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, nov. 1951.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, dez. 2014.

LV, Y.-T. *et al.* Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 196, dez. 2013.

LYALL, K. *et al.* The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. **Annual Review of Public Health**, v. 38, n. 1, p. 81–102, mar. 2017.

MA, D. Q. *et al.* Identification of Significant Association and Gene-Gene Interaction of GABA Receptor Subunit Genes in Autism. **The American Journal of Human Genetics**, v. 77, n. 3, p. 377–388, set. 2005.

MAIN, P. A. *et al.* Folate and methionine metabolism in autism: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 6, p. 1598–1620, jun. 2010.

MANEETON, N. *et al.* Risperidone for children and adolescents with autism spectrum disorder: a systematic review. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 14, p. 1811–1820, 2018.

MARCUS, R. N. *et al.* A Placebo-Controlled, Fixed-Dose Study of Aripiprazole in Children and Adolescents With Irritability Associated With Autistic Disorder. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 48, n. 11, p. 1110–1119, nov. 2009.

MARKRAM K.; RINALDI T.; LA MENDOLA D.; SANDI C.; MARKRAM H. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. **Neuropsychopharmacol**, v. 33, n.4, p. 901-912, 2008.

MASI, G. *et al.* Aripiprazole Monotherapy in Children and Young Adolescents with Pervasive Developmental Disorders: A Retrospective Study. **CNS Drugs**, v. 23, n. 6, p. 511–521, maio 2009.

MATSON, J. L.; GOLDIN, R. L. Diagnosing young children with autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 44–48, dez. 2014.

MELO, P. S. *et al.* Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. **Food Chemistry**, v. 181, p. 160–169, ago. 2015.

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. 13, dez. 2017.

MOHAMED, S. M. *et al.* Vitis vinifera L. seed standardized extract; a promising therapeutic against metabolic syndrome induced by high-fat/high-carbohydrate diet and streptozotocin in rats. **South African Journal of Botany**, v. 167, p. 476–486, 2024.

MOKNI, M.; ELKAHOUI, S.; LIMAM, F.; AMRI, M.; AOUANI E. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochem Res**, v. 32, n. 6, p. 981-987, jun. 2007.

MOORE, S. J. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, n. 7, p. 489–497, jul. 2000.

MORETTI, M. *et al.* Protective Effects of Ascorbic Acid on Behavior and Oxidative Status of Restraint-Stressed Mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 49, n. 1, p. 68–79, jan. 2013.

MURAWSKI N. J.; BROWN K. L.; STANTON M. E. Interstimulus interval (ISI) discrimination of the conditioned eyeblink response in a rodent model of autism. **Behav Brain Res**, v.196, n. 2, p. 297-303, 2009.

NAKASATO, A.; NAKATANI, Y.; SEKI, Y.; TSUJINO, N.; UMINO, M.; ARITA, H. Swim stress exaggerates the hyperactive mesocortical dopamine system in a rodent model of autism. **Brain Research**, v. 1193, p. 128–135, 2008.

NAVIAUX, R. K. *et al.* Low-dose suramin in autism spectrum disorder: a small, phase I/II, randomized clinical trial. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 4, n. 7, p. 491–505, jul. 2017.

NEWSCHAFFER, C. J. *et al.* The Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. **Annual Review of Public Health**, v. 28, n. 1, p. 235–258, abr. 2007.

NUNES, G. D. F. **Modelo Animal de Autismo por Exposição Pré-Natal ao Ácido Valpróico: Análise de Sinapses Excitatórias e Inibitórias**. Orientadora: Carmem Juracy Silveira Gottfried. 2015. Tese (Mestrado em Neurociências)– Instituto de ciências básicas da saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Autism spectrum disorders**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>>. Acesso em: 27 de abril de 2024.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

OOI, Y. P. *et al.* Omega-3 fatty acids in the management of autism spectrum disorders: findings from an open-label pilot study in Singapore. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 8, p. 969–971, ago. 2015.

PERSICO, A. M.; NAPOLIONI, V. Autism genetics. **Behavioural Brain Research**, v. 251, p. 95–112, ago. 2013.

PIERETTI, M. *et al.* Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. **Cell**, v. 66, n. 4, p. 817–822, ago. 1991.

POSEY, D. J.; ERICKSON, C. A.; MCDOUGLE, C. J. Developing Drugs for Core Social and Communication Impairment in Autism. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 17, n. 4, p. 787–801, out. 2008.

POTTER, M. A. *et al.* Pregnancy in a healthy woman with untreated citrullinemia. **American Journal of Medical Genetics**, v. 129A, n. 1, p. 77–82, ago. 2004.

PU, Y.; YANG, J.; CHANG, L.; QU, Y.; WANG, S.; ZHANG, K.; XIONG, Z.; ZHANG, J.; TAN, Y.; WANG, X.; FUJITA, Y.; ISHIMA, T.; WANG, D.; HWANG, S.; HAMMOCK, B. D.; HASHIMOTO, K. Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. **Proceedings of the National Academy Of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 21, p. 11753-11759, 2020.

PU, Y.; YANG, J.; CHANG, L.; QU, Y.; WANG, S.; ZHANG, K.; ZHONGWEI, X.; ZHANG, J.; TAN, Y.; WANG, X.; FUJITA, Y.; ISHIMA, T.; WANG, D.; SUNG, H. H.; HAMMOCK, B. D.; HASHIMOTO, K. Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. **Proceedings of the National Academy Of Sciences of the United States of America**. v. 118, n. 5, feb. 2021.

RAPIN, I. The Autistic-Spectrum Disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 302–303, ago. 2002.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, v. 233p. 357–363, 1994.

RINALDI T.; SILBERBERG G.; MARKRAM H. Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. **Cereb Cortex**, v.18, n.4, p. 763-770, 2008.

ROANE, H. S.; FISHER, W. W.; CARR, J. E. Applied Behavior Analysis as Treatment for Autism Spectrum Disorder. **The Journal of Pediatrics**, v. 175, p. 27–32, ago. 2016.

RODIER, P. M. *et al.* Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 370, n. 2, p. 247–261, jun. 1996.

ROSE, S. *et al.* Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 7, p. e134–e134, jul. 2012.

ROSSIGNOL, D. A.; FRYE, R. E. Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis: Review. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 53, n. 9, p. 783–792, set. 2011.

ROULLET F. I.; WOLLASTON L.; DECATANZARO D.; FOSTER J. A. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. **Neuroscience**, v. 170, n.2, p. 514-522, 2010.

SANDHYA T.; SOWJANYA J.; VEERESH B. Bacopa monniera (L.) Wettst ameliorates behavioral alterations and oxidative markers in sodium valproate induced autism in rats. **Neurochem Res**, v. 37, n.5, p. 1121-1131, 2012.

SANDIN, S. *et al.* Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 5, p. 693–700, maio 2016.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, jul. 2005.

SHAH, P.; CATMUR, C.; BIRD, G. Emotional decision-making in autism spectrum disorder: the roles of interoception and alexithymia. **Molecular Autism**, v. 7, n. 1, p. 43, dez. 2016.

SHEPPARD, K. W. *et al.* Effect of Omega-3 and -6 Supplementation on Language in Preterm Toddlers Exhibiting Autism Spectrum Disorder Symptoms. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 47, n. 11, p. 3358–3369, nov. 2017.

SILVERMAN, J. L.; YANG, M.; LORD, C.; CRAWLEY, J. N. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n.,7 p. 490-502. 2010.

SMITH, T.; IADAROLA, S. Evidence Base Update for Autism Spectrum Disorder. **Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology**, v. 44, n. 6, p. 897–922, nov. 2015.

SÖĞÜT, S. *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, maio 2003.

SOUZA, N. *et al.* The role of the pediatrician in accurate recognition of autistic spectrum disorders and symptoms: literature review. **Residência Pediátrica**, v. 11, n. 3, 2021.

STACK, C.M., LIM, M.A., CUASAY, K., STONE, M.M., SEIBERT, K.M., SPIVAK-POHIS, I., *et al.* Deficits in social behavior and reversal learning are more prevalent in male offspring of VIP deficient female mice. **Exp Neurol**. v. 211, p. 67-84, 2008.

SWEETEN, T. L.; POSEY, D. J.; MCDOUGLE, C. J. High Blood Monocyte Counts and Neopterin Levels in Children With Autistic Disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 9, p. 1691–1693, set. 2003.

TANG, B. L. Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1—A hypothesis. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 4–5, p. 359–361, mar. 2010.

TASHIRO, Y.; OYABU A.; IMURA Y.; UCHIDA A.; NARITA N.; NARITA M. Morphological abnormalities of embryonic cranial nerves after in utero exposure to valproic acid: implications for the pathogenesis of autism with multiple developmental anomalies. **Int J Dev Neurosci**, v. 29, n. 4, p. 359-364, 2011.

TAYLOR, L. E.; SWERDFEGER, A. L.; ESLICK, G. D. Vaccines are not associated with autism: An evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. **Vaccine**, v. 32, n. 29, p. 3623–3629, jun. 2014.

VAMANU, E.; NITA, S. Antioxidant Capacity and the Correlation with Major Phenolic Compounds, Anthocyanin, and Tocopherol Content in Various Extracts from the Wild Edible *Boletus edulis* Mushroom. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

VARGHESE, M. *et al.* Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. **Acta Neuropathologica**, v. 134, n. 4, p. 537–566, out. 2017.

VARNI, J. W. *et al.* Effect of Aripiprazole 2 to 15 mg/d on Health-Related Quality of Life in the Treatment of Irritability Associated with Autistic Disorder in Children: A Post Hoc Analysis of Two Controlled Trials. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 4, p. 980–992, abr. 2012.

WENDEL, A. [44] Glutathione peroxidase. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 1981. v. 77p. 325–333.

WINK, L. K. *et al.* Emerging drugs for the treatment of symptoms associated with autism spectrum disorders. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 15, n. 3, p. 481–494, set. 2010.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, jan. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Autism spectrum disorders**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>>. Acesso em: 27 de abril de 2024.

WYSE, A. T. S. *et al.* Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **NeuroReport**, v. 9, n. 8, p. 1719–1721, jun. 1998.

YENKOYAN, K.; HARUTYUNYAN, H.; HARUTYUNYAN, A. A certain role of SOD/CAT imbalance in pathogenesis of autism spectrum disorders. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 123, p. 85–95, ago. 2018.

YOCHUM C. L.; BHATTACHARYA P.; PATTI L.; MIROCHNITCHENKO O.; WAGNER G. C. Animal model of autism using GSTM1 knockout mice and early post-natal sodium valproate treatment. **Behav Brain Res**, v. 210, n. 2, p. 202-210, 2010.

**Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações**

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 10/03/2025.

1. Identificação do material bibliográfico: ( ) Tese (x) Dissertação ( ) Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: Thayna Patachini Maia Becker

Orientador: Daniela Delwing de Lima      Coorientador: \_\_\_\_\_

Data de Defesa: 27/06/2024

Título:

Instituição de Defesa:

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (x) Sim                      ( ) Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.



Assinatura do autor

Joinville, 10/03/2025

Local/Data