

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

GIULIANA FRANZAGO SALMAZO

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, COMPORTAMENTAL E
BIOQUÍMICA DE CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM
ÓLEO DE *Schizochytrium sp.* E COMPLEXO
VITAMÍNICO/MINERAL**

Bragança Paulista
2022

GIULIANA FRANZAGO SALMAZO – R.A. 202113407

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, COMPORTAMENTAL E
BIOQUÍMICA DE CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM
ÓLEO DE *Schizochytrium sp.* E COMPLEXO
VITAMÍNICO/MINERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof(a) Dr(a) Juliana Mozer Sciani

Bragança Paulista
2022

155.454 Salmazo, Giuliana Franzago
S168a Avaliação clínica, comportamental e bioquímica de crianças com Transtorno do Espectro Autista após suplementação com óleo de schizochytrium sp. e complexo vitamínico/mineral / Giuliana Franzago Salmazo. -- Bragança Paulista, 2022. 48 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Juliana Mozer Sciani.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. TEA. 3. Antioxidantes. 4. DHA. 5. Complexo vitamínico/mineral. 6. Estudo clínico. I. Sciani, Juliana Mozer. II. Título.



SALMAZO, Giuliana Franzago. "Avaliação clínica, comportamental e bioquímica de crianças com transtorno do espectro autista após suplementação com óleo de *schizochytrium sp.* e complexo vitamínico/mineral". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 16 de dezembro de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Guilherme Rabelo Coelho
Instituto Butantan

Profa. Dra. Raquel Girardello
Universidade São Francisco

Dedico este trabalho ao meu esposo Felipe e filho João, o primeiro é meu maior admirador e incentivador, meu companheiro e o segundo a razão de tudo.

Agradecimentos

Iniciei o mestrado sem ter muito conhecimento a respeito das pesquisas acadêmicas ou de como escolher uma linha de pesquisa, no final de uma aula de bioestatística, uma professora muito querida me iluminou e apresentou a melhor orientadora que poderia ter cruzado meu caminho, nada seria possível sem a paciência, dedicação e incentivo dela. Obrigada Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani, que abraçou esse tema com tanto carinho e empenho, obrigada por acreditar que poderia dar certo, o trabalho de um professor foi muito bem representado por você nesse tempo, realmente guiando e orientando, obrigada pela ajuda em cada etapa, desde a revisão bibliográfica, depois a análise bioquímica e estatísticas e todas as etapas envolvidas até a finalização.

Gostaria também de deixar registrado meu agradecimento à Profa. Dra Denise Gonçalves Priolli, que foi a responsável por levar a esse encontro, como disse no começo. À neuropsicóloga Maria Baptista de Oliveira, que auxiliou muito na escolha de escalas e na sua correção, que foi determinante para quantificarmos a evolução dos envolvidos. Aos professores que auxiliaram e acrescentaram conhecimentos essenciais para desenvolver o trabalho e os meus colegas de mestrado que tornaram as aulas mais alegres e enriquecedoras.

Aos participantes do estudo e seus responsáveis, pois não poderíamos seguir em frente sem a adesão, a confiança e a credibilidade que depositaram nesse projeto, quem sabe podendo fazer diferença para tantas crianças com mesmo diagnóstico.

À Universidade São Francisco, pelo apoio, podendo assim realizar e tornar possível o que era apenas uma ideia.

Todos que de alguma forma contribuíram para chegarmos até esse ponto, tem meus mais sinceros agradecimentos e carinho.

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) tornou-se um dos transtornos do neurodesenvolvimento mais estudados na última década, pela sua gravidade, aumento do número de casos e diagnóstico, além da repercussão e impacto social que provoca. Até o momento, não há terapia medicamentosa para o seu tratamento, sendo recomendado uma equipe multiprofissional, que tem como objetivo melhorar habilidades do paciente, como comunicação e comportamento social, e reduzir estereotípias. Antioxidantes foram avaliados no tratamento de pacientes com TEA e alguns têm evidenciado resultados promissores na melhora do comportamento, já que o estresse oxidativo tem demonstrado estar relacionado à doença. Assim, este trabalho teve como objetivo administrar em crianças com TEA um complexo multivitamínico/mineral e óleo de microalga marinha *Schizochytrium sp.* rico em DHA, avaliá-los clínica e bioquimicamente. Quinze indivíduos (2 a 12 anos) com diagnóstico de TEA comprovado pela escala CARS (Child Autism Rating Scale) foram incluídos, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Sendo posteriormente classificados por uma nova escala, a ABAS-3 (Adaptative Behaviour Assessment System - Third Edition) para acompanhamento do quadro da doença. Após isso, usaram o óleo de microalga contendo 200 mg de DHA e 2 mg EPA e do complexo vitamínico/mineral diariamente por 12 semanas, momento em que foram novamente avaliados pelas duas escalas. Antes e após o tratamento, a urina dos pacientes foi coletada para a avaliação bioquímica e de poder antioxidante. Os dados clínicos foram avaliados estatisticamente pelo teste por postos sinalizados de Wilcoxon, de amostras relacionadas (comparando o mesmo indivíduo antes e após o tratamento), com erro alpha de 0,05. De 15 pacientes recrutados, 12 prosseguiram no estudo. Observado qualitativamente que muitos parâmetros comportamentais melhoraram com o uso dos produtos, como a comunicação, interação e seletividade alimentar. CARS, domínio social e GAC (Composto Adaptativo Geral), da escala ABAS-3, foram estatisticamente significantes quando comparados nos dois momentos. O domínio social está relacionado à percepção de pensamentos, sentimentos e experiências dos outros, empatia, habilidades de comunicação interpessoal, amizade e julgamento social, que corrobora com a evolução percebida pelos pais das crianças. Ademais, a significância do GAC mostra uma melhora no aspecto global dos pacientes, o que reforça novamente a percepção da mudança de comportamento dos indivíduos. Outros parâmetros não foram estatisticamente diferentes, porém quando analisados por indivíduo, muitos apresentaram relevância, o que pode ser um indício de um resultado ainda melhor. Dados bioquímicos mostraram a presença de compostos estatisticamente diferentes da condição antes e após o tratamento, com ênfase no aumento de alguns aminoácidos. Além disso, o poder antioxidante da urina foi estatisticamente aumentado em relação à antes do tratamento, confirmando a correlação entre diminuição do estresse oxidativo com o uso do produto e a melhora clínica dos participantes. Desta forma, é possível concluir que o uso diário por 12 semanas de óleo rico em DHA e complexo multivitamínico/mineral causaram melhora significativa no comportamento e escala da doença de crianças com TEA, com a diminuição do estresse oxidativo como um dos mecanismos de ação.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista. Antioxidantes. DHA. Estudo clínico.

ABSTRACT

Autistic Spectrum Disorder (ASD) has become one of the most observed neurodevelopmental disorders in the last decade, due to its severity, increased number of cases and diagnosis, in addition to the repercussions and social impact it causes. So far, there is no drug therapy for its treatment, and a multidisciplinary team is recommended, which aims to improve the patient's skills, such as communication and social behavior, and reduce stereotypes. Antioxidants have been evaluated in the treatment of patients with ASD and some have proven promising results in improving behavior, as oxidative stress has been shown to be related to the disease. Thus, this work aimed to administer to children with ASD a multivitamin/mineral complex and marine microalgae oil *Schizochytrium* sp. rich in DHA, evaluate them clinically and biochemically. Fifteen individuals (2 to 12 years old) with a diagnosis of ASD confirmed by the CARS scale (Child Autism Rating Scale) were included, according to the inclusion and exclusion criteria. It is later classified by a new scale, the ABAS-3 (Adaptive Behavior Assessment System - Third Edition) for monitoring the disease. After that, they used microalgae oil containing 200 mg of DHA and 2 mg of EPA and the vitamin/mineral complex daily for 12 weeks, at which time they were evaluated in depth using two scales. Before and after treatment, patients' urine was collected for biochemical and antioxidant evaluation. Clinical data were statistically evaluated by Wilcoxon's signed-rank test, from Related Reflection (comparing the same individual before and after treatment), with an alpha error of 0.05. Of 15 patients recruited, 12 received the study. Qualitatively observed that many behavioral parameters improved with the use of products, such as communication, interaction and food selectivity. CARS, social domain and GAC (General Adaptive Composite), from the ABAS-3 scale, were statistically significant when compared in the two moments. The social domain is related to the perception of thoughts, feelings and experiences of others, empathy, interpersonal communication skills, friendship and social judgment, which corroborates the evolution perceived by the children's parents. Furthermore, the significance of the GAC shows an improvement in the patients' global appearance, which again reinforces the perception of change in the individuals' behavior. Other parameters were not statistically different, but when analyzed by individual, many were relevant, which may be an indication of an even better result. Biochemical data showed the presence of statistically different compounds of the condition before and after treatment, with emphasis on the increase of some amino acids. In addition, the antioxidant power of the urine was statistically increased compared to before treatment, confirming the correlation between the decrease in oxidative stress with the use of the product and the clinical improvement of the participants. Thus, it is possible to conclude that the daily use of oil rich in DHA and multivitamin/mineral complex for 12 weeks caused a significant improvement in the behavior and scale of the disease in children with ASD, with a decrease in oxidative stress as one of the mechanisms of action.

Keywords: Autism Spectrum Disorder. Antioxidants. DHA. Clinical Trial.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ABAS-3	Adaptive Behavior Assessment System Third Edition
ASD	Autism Spectrum Disorder
CARS	Childhood Autism Rating Scale
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças Norte-Americano
CNVs	Copy Number Variations
DHA	Ácido Docosaheptaenóico / Docosaheptaenoic Acid
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª Edição
EPA	Ácido Eicosapentaenóico / Eicosapentaenoic Acid
EROS	Radicais Livres ou Espécies Reativas de Oxigênio
PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados
FXS	Síndrome do X frágil
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GAC	General Adaptive Composite Domain
GSSG	Glutathione Oxidativa no sangue
GSH	Glutathione / Glutathione
MDA	Malondialdeído
MECP2	<i>Methyl-CpG-binding Protein 2</i>
miRNA	microRNAs
NAC	N-acetilcisteína
PRDX2	Peroxirredoxina 2 / Peroxiredoxin 2

PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homologue</i>
ROS	Reactive Oxygen Species
RTT	Síndrome de Rett
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SMD	Síndrome de duplicação de <i>Methyl-CpG-binding Protein 2</i>
TEA	Transtorno do Espectro Autista
tGSH	Glutationa total no sangue
TFA	Trifluoroacetic Acid
TSC	Complexo de Esclerose Tuberosa

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Histórico e epidemiologia	13
1.2 Fisiopatologia	14
1.3 Diagnóstico e avaliação laboratorial	15
1.4 Estresse Oxidativo e TEA	16
1.5 Antioxidantes e TEA	19
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivo Específico	21
3. Capítulo 1	22
4. Conclusão	43
5. Referências Bibliográficas	44

1. Introdução

1.1. Histórico e Epidemiologia

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento, descrito pela primeira vez pelo austríaco Leo Kanner, em 1943, ao publicar *Os distúrbios autísticos de contato afetivo*, onde identificou um grupo de 11 crianças, as quais acreditava que tinham "uma incapacidade inata de estabelecer o contato afetivo habitual". Em seu trabalho, o autor enfatizava a retração social, a obsessão por comportamentos repetitivos e a incapacidade de uso da linguagem para comunicação (ZIATS; PATTERSON; FRIEZ, 2021).

No ano seguinte, Hans Asperger realizou a defesa de sua tese de livre docência, quando nomeou uma síndrome como Psicopatia autística infantil. Na síndrome, foi descrita as dificuldades de integração social das crianças, mas que, à diferença das descritas por Kanner, possuíam um bom nível de inteligência e linguagem, e os sintomas apareciam após o terceiro ano de vida (WING, 2005).

Apenas em 1981, Lorna Wing passou a associar a tese de Asperger com o autismo de Kanner, considerando as alterações como parte da mesma entidade, sendo uma o ponto mais leve e a outra o mais grave da doença, divulgando o autismo e a noção de espectro. No estudo, são descritos elementos deficitários que toda pessoa com autismo apresenta: comunicação ou linguagem, interação social, pensamento e imaginação (DIAS, 2015; VERHOEFF, 2013).

A prevalência do TEA, de acordo com o CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças Norte-Americano), é de 1 caso para cada 54 crianças, ocorrendo em todas as etnias, raças e grupos socioeconômicos, sendo 4 vezes mais comum no sexo masculino do que no feminino (CDC, 2020). Deve-se levar em consideração que é descrito em meta-análise uma diferença em relação a essa proporção, onde foi observado que pode estar mais próximo de 3:1. Devido a um preconceito de gênero no diagnóstico, meninas que atendem aos critérios do TEA correm um risco desproporcional de não receber um diagnóstico clínico (LOOMES; HULL; MANDY, 2017). No Brasil, estima-se que na faixa etária de crianças pré-escolares de zero a quatro anos, de um total de 16.386.239 crianças, 114.704 poderiam ser diagnosticadas com TEA (BOSA; TEIXEIRA, 2017 apud ROCHA et al., 2019).

1.2. Fisiopatologia

Os indivíduos com TEA são classificados em sindrômicos e não sindrômicos, baseado exclusivamente em critérios clínicos. O termo “síndrome” refere-se a condições nas quais ocorre conjunto de um fenótipo específico e/ou características dismórficas. Para essas condições, a etiologia na maioria dos casos é conhecida e pode envolver anormalidades cromossômicas, variações no número de cópias submicroscópicas e variantes patogênicas em um único gene, como na síndrome do X frágil (FXS), síndrome de Rett (RTT), Síndrome de duplicação de MECP2 (*Methyl-CpG-binding Protein 2*) (SMD), complexo de esclerose tuberosa (TSC) e síndrome da macrocefalia PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue*). O termo "não-sindrômico" normalmente se refere ao "autismo clássico", como foi descrito por Kanner, sendo que na sua maioria a etiologia é desconhecida (SZTAINBERG; ZOGHBI, 2016).

No Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, a orientação para indivíduos com alterações genéticas conhecidas, como as citadas anteriormente, deve receber como especificador no seu diagnóstico "associado a condição médica ou genética conhecida ou a fator ambiental" (APA - Associação Americana de Psiquiatria, 2014).

Na análise do TEA em famílias e/ou avaliação de gêmeares é estimada a proporção da variância fenotípica devido a fatores genéticos (a herdabilidade) em cerca de 90%, tornando o TEA o transtorno mais hereditário dentre os transtornos do desenvolvimento. Como consequência, a pesquisa etiológica tem se concentrado predominantemente em fatores genéticos. Embora estudos recentes com gêmeos seja indicada a alta herdabilidade, um grande estudo de gêmeos realizado recentemente também indicou um papel substancial para influências ambientais compartilhadas. Na literatura, os resultados de estudos familiares também levantam questões sobre a influência relativa de fatores genéticos e contribuem para a incerteza quanto à etiologia do TEA (SANDIN et al., 2014).

Sendo assim, a etiologia da doença é pouco compreendida (GVOZDJÁKOVÁ et al., 2014), mas pode envolver interações complexas entre os genes e os fatores ambientais. (GESCHWIND; STATE, 2015; MODABBERNIA; VELTHORST; REICHENBERG, 2017; LIU et al., 2022).

O tratamento principal do TEA consiste no acompanhamento dos pacientes com profissionais das áreas de psicoterapia, fonoaudiologia, fisioterapia, terapia ocupacional, psicopedagogia e neurologia, no sentido de melhorar as habilidades do paciente, como comunicação e comportamento social, e reduzir estereotípias (GADIA et al., 2004).

1.3. Diagnóstico e avaliação laboratorial

O diagnóstico do TEA é realizado pela história (anamnese) e exames clínicos identificando os principais sintomas que caracterizam a doença. Em 2013, foi publicado o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 5ª Edição (DSM-5), atualizando os critérios diagnósticos, considerando que para realizá-lo o paciente deve apresentar déficits persistentes na comunicação social e na interação social em múltiplos contextos (Critério A) e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades (Critério B), estando presentes desde o início da infância e limitando ou prejudicando o funcionamento diário (Critérios C e D). O estágio em que o prejuízo funcional fica evidente irá variar de acordo com características do indivíduo e seu ambiente (APA, 2014, HODGES; FEALKO; SOARES, 2020).

Testes genéticos são atualmente empregados para auxiliar no diagnóstico, porém, considerando a característica de polimorfismo genético, o teste se torna muito impreciso. Nesse sentido, o perfil de expressão de miRNA foi elucidado para o TEA, e foram descobertos 14 miRNA diferencialmente expressos na saliva dos pacientes, comparado com indivíduos saudáveis. Desses 14 genes, 4 estavam pouco expressos (*downregulated*) e 10 super expressos (*upregulated*) nos pacientes com TEA (HICKS et al. 2016).

Biomarcadores imunológicos, bioquímicos e hormonais para avaliar o sistema nervoso central têm sido exaustivamente estudados, a fim de se encontrar moléculas que possam caracterizar o TEA. No entanto, ainda não existe um consenso sobre esses marcadores, uma vez que a doença é de alta complexidade e os sintomas variados, e a etiologia da doença ainda não está bem estabelecida.

A determinação dos níveis de serotonina no sangue tem sido o mais aceito. A serotonina foi 20% menor em pacientes sem a doença, quando comparado com TEA. Concomitantemente, o ácido gama-aminobutírico (GABA) aumentou nos pacientes com a doença (FARAH et al., 2018).

Na análise de fluidos biológicos, como urina, foi observada uma elevada concentração de peptídeos e proteínas, provenientes do catabolismo de proteínas da dieta. Assim, estabeleceu-se uma possível correlação entre consumo de proteínas e autismo. Nesse sentido, peptídeos opióides foram encontrados em abundância nos pacientes autistas, o que explica as alterações no comportamento dos pacientes (REICHELDT; KNIVSBERG, 2009). O mais estudado, a ocitocina, foi encontrado em níveis diminuídos na saliva de pacientes com TEA, no início do desenvolvimento dos sintomas, em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, os dados não foram suficientes para a obtenção de um resultado significativo e a obtenção de um marcador para a doença (RUTIGLIANO et al., 2016).

Na análise de proteômica é denotada a expressão diferencial de algumas proteínas envolvidas na sinalização de cálcio, neurotransmissão dopaminérgica, glutamatérgica, tráfico de vesículas pré-sinápticas e citocinas pró-inflamatórias. Apesar disso, não foi estabelecida uma associação com o quadro clínico dos pacientes (PARK, 2020). Curiosamente, os estudos peptidômicos não foram realizados para avaliar o perfil geral de peptídeos secretados em amostras biológicas, até o momento da revisão de trabalhos da literatura.

De qualquer forma, pesquisadores ainda estudam biomarcadores, uma vez que o diagnóstico precoce e a intervenção melhoram os sintomas de crianças com TEA, mas faltam métodos diagnósticos laboratoriais que confirmem a doença a tempo suficiente para um bom tratamento.

1.4. Estresse oxidativo no TEA

Antioxidantes são moléculas capazes de reduzir os efeitos causados pelos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO), que são compostos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa, e com isso se tornam altamente instáveis, com pequena meia-vida e quimicamente reativas (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Em situações fisiológicas, o organismo libera moléculas antioxidantes que atuam na neutralização das EROs,

visando diminuir a lesão tecidual e celular. O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e antioxidantes, em uma situação fisiológica, é conhecido como estresse oxidativo (RAHAL et al., 2014).

Quando o antioxidante não consegue eliminar adequadamente os radicais de oxigênio reativos, o sistema biológico sofre um estresse, resultando em danos às biomoléculas e às funções cerebrais, incluindo interrupção da metilação, diminuição da glutathione, aumento da oxidação e outras funções (BJØRKLUND et al., 2016; LIU et al., 2022).

Os radicais livres têm sido relacionados ao desenvolvimento de várias doenças, como doenças cardíacas (cardiopatias, aterosclerose), doenças pulmonares, doenças neurodegenerativas e câncer (LIU et al., 2017).

O estresse oxidativo pode desempenhar um papel central na patogênese do TEA, que se deve ao efeito cumulativo de danos ambientais tóxicos, que podem levar a danos neuronais em indivíduos geneticamente suscetíveis (BJØRKLUND et al., 2020; LIU et al., 2022).

A descrição do aumento do estresse oxidativo em pacientes com TEA é mostrada principalmente pela abundância de moléculas oxidantes, como peróxidos lipídicos e ácido tiobarbitúrico, associado à atividade de enzimas antioxidantes reduzida, principalmente a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase, além de níveis reduzidos de glutathione e cisteína (BJØRKLUND et al., 2020). Outros mecanismos geradores de radicais livres, tais como os níveis aumentados de citocinas e óxido nítrico (ROSE et al., 2012a), assim como biomarcadores de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e DNA podem ser encontrados no sangue, na urina e no cérebro (BJØRKLUND et al., 2020).

Estudos mais recentes têm corroborado com esses resultados acima mencionados, e foram descobertas novas substâncias que interferem nessa desregulação entre oxidantes e antioxidantes. Em uma meta-análise foi observado que a glutathione oxidativa no sangue (GSSG), homocisteína, S-adenosilhomocisteína (SAH), cobre, óxido nítrico e malondialdeído (MDA) foram significativamente maiores nas crianças com TEA do que nas crianças do grupo controle. Em contraste, houve redução de glutathione total no sangue (tGSH), glutathione (GSH), GSH/GSSG, tGSH/GSSG, metionina, cisteína, S-adenosilmetionina (SAM)/SAH, vitaminas (B9, B12, D e E) e cálcio em crianças com TEA em relação aos controles (CHEN et al., 2021).

Foi ainda observado que a neuroinflamação está relacionada à liberação de peroxirredoxina 2 (PRDX2) após a oxidação de proteínas nos indivíduos com TEA, e a ação dos EROs causam peroxidação lipídica e de proteínas/DNA, que por sua vez induzem a neuroinflamação, podendo provocar a morte do neurônio (SALZANO et al., 2014). Além disso, a glutatona (GSH), quando reduzida, induz a liberação de EROs, o que contribui ainda mais para a inflamação (GHEZZI, 2011).

Há evidências de neurodegeneração e neuroinflamação nesses pacientes, fenômenos que estão intimamente relacionados ao estresse oxidativo (KERN et al., 2013; PARDO et al., 2005). O status materno de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) regula a atividade microglial e as vias neuroinflamatórias durante o desenvolvimento do cérebro de uma criança. Em crianças com TEA, acredita-se que o metabolismo de PUFA seja deficiente ou anormal, levando ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento do estresse oxidativo e desequilíbrio na formação e ação dos neurotransmissores. (VESELINOVIĆ et al., 2021)

Os ácidos graxos poliinsaturados podem regular a via de sinalização antioxidante e modular processos inflamatórios. Muitos estudos mostram que a maior ingestão de PUFAs ômega-3, especialmente o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), estão associadas a uma menor incidência de doenças crônicas caracterizadas por inflamação elevada (DJURICIC; CALDER, 2021). Tendo em vista o aumento alarmante na incidência de doenças crônicas, o interesse e a demanda do consumidor estão aumentando rapidamente por fontes dietéticas naturais de PUFAs ômega-3. Entre as fontes vegetais, o óleo de microalgas e *Thraustochytrids* pode fornecer diretamente EPA e DHA, sendo usadas para a produção comercial de EPA e DHA veganos. *Thraustochytrids* é um clado heterotrófico semelhante a um fungo de *Stramenopiles*, sendo referidos como algas na literatura. São uma fonte comercialmente importante de EPA e DHA na dieta e especialmente espécies do gênero *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Crypthecodinium* e *Ulkenia*, são amplamente utilizados para a produção comercial de EPA e DHA veganos. Alguns *Schizochytrium sp.* pode acumular uma quantidade significativa de EPA e DHA (16,18 e 33,72%, respectivamente). (PATEL et al., 2021; RUSSO et al., 2021; SAINI et al., 2021; SILVA et al., 2019)

Embora historicamente tenha havido muito foco no papel do DHA no desenvolvimento cognitivo e visual inicial, devido ao seu alto conteúdo no cérebro e no sistema visual, os PUFAs

ômega-3 provavelmente têm papéis importantes no cérebro além da infância, e provavelmente são importantes para o cérebro. (DJURICIC; CALDER, 2021).

1.5. Antioxidantes e TEA

Estudos clínicos foram feitos com suplementação de antioxidantes naturais em crianças com TEA. O composto mais estudado foi a N-acetilcisteína (NAC), no entanto, com resultados contrastantes, sendo demonstrado em alguns casos ausência de melhora significativa no quadro clínico (WINK et al., 2016) e em outro a presença de resultados promissores (HARDAN et al., 2012). Concomitantemente, na avaliação da formulação contendo luteolina e quercetina em crianças de 4 a 10 anos, por 26 semanas, foi demonstrada melhora na funcionalidade adaptativa e comportamento geral, sem causar qualquer efeito adverso (TALIOU et al., 2013). Outros antioxidantes, como chocolate 70% cacau, sulforafano, coenzima Q10 e leite de camelo, causaram melhora da comunicação social e comportamento não usual. Esses estudos indicam a redução de estresse oxidativo, aumento de atividade de enzimas antioxidantes e melhora nos níveis de moléculas antioxidantes não-enzimáticas (MANIVASAGAM et al., 2020; XIE et al., 2018; AHMAD et al., 2018).

Uma meta-análise mostrou que os antioxidantes (N-acetilcisteína e outros antioxidantes) e NAC isoladamente foram mais eficazes do que o placebo na melhoria dos sintomas específicos em pacientes com TEA, principalmente irritabilidade e distúrbios de comunicação, com tendência de melhora nos comportamentos estereotipados e hiperatividade. O efeito do NAC na redução do comportamento anormal no TEA pode ser explicado por dois mecanismos diferentes: regulação do glutamato e antioxidante. (LIU et al., 2022)

O uso de antioxidantes provenientes de produtos naturais tem sido cada vez mais utilizados para promoção de saúde e tratamento de diversas doenças, sendo uma possível alternativa para o tratamento do TEA (ROSSIGNOL, 2009). Logo, tem sido investigado e utilizado antioxidantes presentes em plantas, frutas e outros alimentos e, se em associação, poderiam levar a melhorias nos pacientes. Como o estresse oxidativo e a inflamação estão fortemente interligados, a suplementação

com anti-inflamatórios pode auxiliar na redução dos níveis de radicais de oxigênio nos pacientes. Como prova de conceito, o uso de anti-inflamatórios mostrou benefícios em indivíduos com TEA (PANGRAZZI; BALASCO; BOZZI, 2020a).

A literatura tem descrito o papel da rede vitamina E/vitamina C/glutationa na eliminação de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs) e as deficiências observadas com TEA, beneficiando-se também do consumo de alimentos ricos em compostos nutracêuticos, que podem apresentar efeitos aditivos ou sinérgicos. Em particular, os compostos nutracêuticos estão presentes em concentrações muito altas em plantas, peixes e crustáceos, essas moléculas podem direcionar a inflamação e o estresse oxidativo e diminuir os danos em vários órgãos, incluindo o cérebro (PANGRAZZI; BALASCO; BOZZI, 2020b).

Vários estudos relataram níveis mais baixos de EPA e DHA na corrente sanguínea de crianças com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade ou transtornos do espectro autista do que em crianças de um grupo controle e foi postulado que a normalização dos níveis de ácidos graxos resultaria em benefício clínico nessas condições, porém com muitas divergências quando foram revisados e submetidos à meta-análise (DJURICIC; CALDER, 2021).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar pacientes crianças com TEA, administrar polivitamínico/mineral e óleo de microalgas marinhas *Schizochytrium sp.* com ácido docosahexaenóico (DHA) e avaliá-los clínica e bioquimicamente.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar clinicamente crianças com TEA e separá-los por graus da doença;

Administrar diariamente às crianças com TEA grave polivitamínico/mineral e óleo de microalgas marinhas *Schizochytrium sp.* rico em DHA por 12 semanas;

Avaliar diferenças clínicas nos indivíduos antes e após o tratamento por meio das escalas CARS e ABAS-3;

Obter a urina dos pacientes para análise de peptídeos e proteínas globais, em resposta ao tratamento;

Quantificar a capacidade antioxidante da urina dos pacientes.

3. Capítulo 1

Artigo submetido à revista *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biology Psychiatry*

Neste artigo mostramos os efeitos da administração por 12 semanas do óleo da alga marinha *Schizochytrium*, rico em DHA, associado a um complexo multivitamínico e mineral em crianças com transtorno do espectro autista. Além de mostrar a melhora em diversos aspectos, demonstramos que houve aumento do poder antioxidante e alguns aminoácidos, que apontam para os mecanismos de ação dos compostos.

Effects of Marine *Schizochytrium* sp. Oil and Multi-Vitamin & Mineral Complex on Autism Spectrum Disorder in Children

Giuliana Franzago Salmazo^{1,2}, Maria Aparecida Baptista de Oliveira³, Fernando Augusto Lima Marson⁴, Juliana Mozer Sciani^{1,2*}

¹Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, Universidade São Francisco, São Paulo, Brazil

²Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, São Paulo, Brazil

³Clínica de atendimento multidisciplinar Espaço Recriar-se

⁴Laboratório de Genética Médica e Genética Humana, Universidade São Francisco, São Paulo, Brazil

*corresponding author

Av. São Francisco de Assis, 218, Bragança Paulista – São Paulo, CEP: 12916-900

Telefone: +55 11 2454-8298

e-mail: juliana.sciani@usf.edu.br

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a syndrome characterized by alterations in social interaction and communication, frequently associated with stereotyped patterns of interests and activities, such as repetitive behavior. The cause of ASD is genetic, but the environment contributes to the disease's development. Inflammation and oxidative stress are frequently observed in such patients, and the administration of antioxidants and anti-inflammatory compounds has been evaluated in ASD patients, considering that there is no pharmacological treatment yet. In this work, we assessed the administration of the Marine *Schizochytrium* sp. oil, containing 200 mg of docosahexaenoic acid (DHA), combined with a Multi-Vitamin & Mineral complex, daily for 12 weeks in two to 12 years children with severe ASD, evaluated by Childhood Autism Rating Scale (CARS) and Adaptive Behavior Assessment System Third Edition (ABAS-3) scale before and after the treatment. CARS and ABAS-3 (general adaptive composite and social domain) were statistically different after the treatment. Although not statistically significant, score of conceptual and practical domains from ABAS-3 was also improved in several patients. Among these domains, communication and visual contact were improved in all patients, and vocabulary, interaction, feeding, and food selectivity were enhanced in some of them. The total antioxidant capacity in urine increased after the treatment, as well as some metabolites, such as amino acids. These data show that the continuous use of Marine *Schizochytrium* sp. Oil and Multi-Vitamin & Mineral Complex can help control characteristic symptoms of ASD.

Keywords: autism spectrum disorder, children, docosahexaenoic acid, multi-vitamin & mineral complex, clinical trial

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a syndrome involving neurodevelopmental dysfunction, characterized by alterations in social interaction and communication (both verbal and nonverbal) and stereotyped patterns of interests and activities, such as repetitive behavior (Sanchack; Thomas, 2016; Barnard-Brak et al., 2016).

There is no consensus about the causes of ASD, although the genetic theory has been the most acceptable, added to environmental factors that contribute to the disease development, as it can increase inflammatory responses in the brain (Liu et al., 2022). Recent advances in genetics and genomics have allowed for the identification of an increasingly high number of ASD-associated gene variants, including chromosomal deletions or duplications (copy number variations, CNVs), *de novo* and familial pathogenic variants, and epigenetic in candidate and novel genes (Pangrazzi et al., 2020).

Patients with ASD can present oxidative stress due to mitochondrial dysfunction and inflammation, which causes increased reactive oxygen species (ROS) levels summed to reduced antioxidant capacity. ROS action causes lipid peroxidation and oxidized proteins/DNA, which induce neuroinflammation, and may cause neuron death. Neuroinflammation is related to the release of peroxiredoxin 2 (PRDX2) after protein oxidation (Salzano et al., 2014). Moreover, glutathione (GSH), when reduced, induces ROS release, which contributes to inflammation (Ghezzi, 2011). In fact, lipid peroxidation has been considered a biomarker for ASD, as well as protein and DNA oxidation, which have been found in blood, urine (Bjørklund et al., 2020), and the brain (Rose et al., 2012). Nevertheless, no specific biochemical test is available to diagnose ASD yet.

The activity of antioxidant enzymes was reduced, particularly glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase, besides the reduced levels of GSH and cysteine (Söğüt et al., 2003). A study shows that added to the dysfunctional antioxidant mechanisms in patients with ADS, the levels of endogenous antioxidant molecules are reduced compared to healthy individuals (Manivasagam et al., 2020). Moreover, it has been established that high ROS concentrations can activate signaling pathways that induce the secretion of pro-inflammatory

cytokines and chemokines (Hsieh; Yang, 2013). Thus, an external source of antioxidants has been studied to restore the ROS scavenging system and counteract oxidative stress. In this sense, clinical trials using antioxidants from several sources and types have been conducted in patients with ASD (Liu et al., 2022).

Vitamins are important endogenous and exogenous antioxidants. Vitamin C is hydrosoluble, acting on an aqueous compartment – and is not sufficient to inhibit lipid peroxidation, but it is a highly efficient antioxidant by scavenging radicals (Bianchi; Antunes, 1999). Vitamin E is found in vegetable oils and is liposoluble, highly absorbed by the intestine, and able to prevent lipid peroxidation in the plasmatic membrane (Reboul et al., 2007). Vitamin A is a liposoluble antioxidant, important for cell growth and differentiation, and able to inhibit the oxidation of compounds (Ferreira et al., 2010).

Considering ASD a neurological disease, antioxidants or other therapeutic compounds must cross the blood-brain barrier in an optimal therapeutic concentration, so liposoluble characteristics of such compounds may surpass this problem. Thus, liposoluble vitamins and oils are being considered for treating brain diseases. It is essential to mention that, up to now, no treatment has been available for ASD (Saini et al., 2021; Djuricic; Calder, 2021).

Omega-3 and omega-6 are classified as polyunsaturated fatty acids, relevant for their biological proprieties, being the omega-6 related to vasoconstriction, inflammation, and platelet aggregation, and omega-3 to anti-inflammatory and antioxidant (Saini et al., 2021; Djuricic; Calder, 2021).

Omega-3 is composed of stearidonic acid, docosapentaenoic acid, eicosapentaenoic acid, and docosahexaenoic acid (Saini; Keum, 2018), which are not produced by the human body. Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) has a vital role in neurodevelopment (Salem et al, 2001), neurite growth and processes, synapsin formation, synaptic protein expression, and hippocampal neurotransmission (Kim et al., 2022). This fatty acid is abundant in micro and macroalgae – e.g., oil from *Schizochytrium* sp can provide 33.7 to 63% of DHA (Saini et al., 2021).

In this work, we studied the daily administration, for 12 weeks, of marine *Schizochytrium* sp. oil, containing 200 mg of DHA, combined with a Multi-Vitamin & Mineral complex, in two to 12 years children with severe ASD, in checking the improvement of the disease symptoms and biochemical aspects of urine.

Methods

Study design and participants

This clinical trial was designed as a case series, where we tracked all the subjects after exposure to the product (Marine Schizochytrium sp. Oil and Multi-Vitamin & Mineral Complex). The study was approved by the Ethics Committee of São Francisco University (CAAE 51579821.6.0000.5514) and was conducted according to the current laws and rules that protect personal data and interests.

We included participants between two and 12 years old (y.o.), male or female, with ASD diagnosed by Childhood Autism Rating Scale (CARS) (score greater than 29) and not syndromic. Patients with non-conclusive diagnosis, CARS between 15 to 29, previous use of antioxidants (last 30 days), syndromic or with epilepsy were not enrolled.

The CARS is widely used for evaluating patients with ASD, validated and translated in several diagnostic centers around the world; it consists of 15 items of several skills, from personal relationships to fear, verbal communication, and consistency of intellectual response, parameters used as outcome (Pereira et al., 2008; Kaat et al., 2021).

After recruiting, participants were evaluated by the Adaptive Behavior Assessment System Third Edition (ABAS-3) scale for a baseline score considering four criteria: adaptive functionality, general behavior, social communication, and unusual behavior. Twelve weeks later, with daily use of the product, the participants were again evaluated by the ABAS-3 scale.

ABAS-3 scale, which is widely used for people with intellectual disabilities and developmental disorders and is appropriate for individuals from birth to 8 years old. This scale measures daily living skills, considered helpful in assessing developmental delays, intellectual disability, learning disabilities, neuropsychological disorders, sensory or physical impairments, and autism spectrum disorder (Emam et al., 2019; Oakland; Harrison, 2008). Eleven skill areas were evaluated, with staggered points, such as communication, community use, pre-academic knowledge, leisure, self-care, life in the home environment, health and safety, self-direction, social, motor and communication, for the three domains: conceptual, social, practical and GAC (Emam et al., 2019; Oakland; Harrison, 2008).

Thus, the outcome was the score obtained by both scales (CARS and ABAS-3) and the analysis of urine, described in the item 2.2.

The withdrawal was considered if discontinuous use of the product or inadequate adherence to the treatment, or any possible adverse effects/complications inherent from the disease were observed.

Before-after the intervention, urine was collected in sterile tubes, which were immediately sealed, frozen, and maintained at -20°C until the experiments.

Intervention

The product provided to the participants (in a liquid formulation) was marine *Schizochytrium* sp. microalga oil enriched with DHA and a Multi-Vitamin & Mineral complex. Marine *Schizochytrium* sp. microalga oil was commercially obtained (Myralis Pharma), composed of 200 mg DHA and 2 mg eicosapentaenoic acid. The intake of this oil was 2 mL/day. The Multi-Vitamin & Mineral complex supplement composition is shown in Table 1, as well as the quantity administered daily. The product was administered once a day, always at the same time, for 12 weeks.

TABLE 1. Composition and quantity of compounds present in the Multi-Vitamin & Mineral complex, administered to participants with an autism spectrum disorder.

continua

Compound	Quantity/day
Vitamin A	400 mcg
Vitamin B1	0.5 mg
Vitamin B2	0.5 mg

TABLE 1. Composition and quantity of compounds present in the Multi-Vitamin & Mineral complex, administered to participants with an autism spectrum disorder.

		<i>conclusão</i>
Vitamin B6	0.5 mcg	
Vitamin B12	0.9 mcg	
Vitamin C	30 mg	
Vitamin D	5 mcg	
Vitamin E	5 mg	
Panhotenic Acid	2 mg	
Copper	340 mcg	
Niacin	6 mg	
Selen	16 mcg	
Zinc	4 mg	

Biochemical analysis

Aliquots of urine were centrifuged (10,000 r.p.m. for 10 min) and diluted in phosphate-saline buffer (50 mM, pH 7.5) 1:10 (v:v).

Samples were loaded in a C18 column (Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm, Waters Co.) coupled to a reversed-phase ultraperformance liquid chromatography system (Acquity UPLC H-Class, Waters Co., USA). The elution was performed in a two-solvent system: (A) trifluoroacetic acid (TFA)/H₂O (1:1,000)

and (B) TFA/acetonitrile/H₂O (1:900:100) at a constant flow rate of 0.2 mL/min with a 1-100% gradient of solvent B over 16 min. The column eluates were automatically inserted in the mass spectrometry (Xevo GS-XS QToF, Waters Co. USA), operating in positive, MS^e

centroid, and resolution mode. Spectra were obtained in 30,000 resolution, 3 kV cone voltage, 150°C source temperature, 350°C desolvation temperature, and 600 L/h desolvation gas flow, in a range of 100 to 600 m/z, in high energy (20 to 30 V ramp) and low energy (3 V). Raw data were analyzed by Progenesis QI (Waters Co., USA) to identify the compounds by comparison, using HMDB and massbank databases, and to determine statistical differences between before-after treatment.

Moreover, the total antioxidant capacity of urine, before and after treatment, was determined by a kit (antioxidant Assay Kit, 709001, Cayman Chemical), following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Wilcoxon matched-pairs signed-rank test was applied to compare before-after treatment in each participant by IBM SPSS Statistics Software for Macintosh (v. 27.0). It was considered an alpha error of 0.05. Figures were drawn with GraphPad Prism Software (v. 8.0 for Mac), GraphPad Software, La Jolla, California, USA.

Results

The protocol of the study is shown in Figure 1. Initially, we assessed 25 participants, but 10 could not fit the inclusion/exclusion criteria due to the use of drugs (e.g., anticonvulsants and antipsychotics), had epilepsy or refused to participate. Thus, we recruited 15 participants, according to the inclusion criteria, but 3 of them were excluded due to treatment discontinuation. The main reason for discontinuation was the difficulty in product intake. The

12 participants were included in the analysis and received the product.

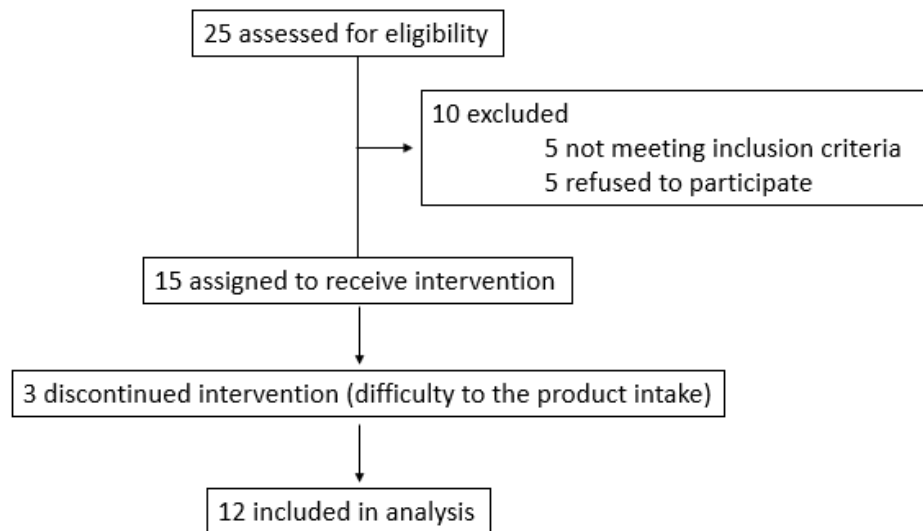


Figure 1. Protocol of the study and number of participants included and excluded.

From 12 participants with ASD enrolled, 9 were male (Table 2). The age of participants varied from two years and ten months to six y.o., although the inclusion criteria were established up to 12 y.o. The time to diagnosis was determined from one year and three months up to three years and seven months.

Several skills were evaluated (Table 2), and communication and visual contact were improved in all participants after the treatment, according to the observations made by their parents and pediatricians. Other parameters, such as vocabulary, interaction, feeding, and food selectivity, were improved for some participants, indicated as yes – Y - in (Table 2). No altered parameters are mentioned in the table as ‘N’.

TABLE 2. Characterization (sex, age, and time to diagnosis) and response to the Marine *Schizochytrium* sp. Oil and Multi-Vitamin & Mineral complex in participants with autism spectrum disorder.

Participant	Gender	Age	Time to diagnostic	Personal					
				Communication	Vocabulary	interaction	Food/feeding	Food selectivity	Eye contact
1	F	5 year	3 year	Y	N	Y	Y	Y	Y
2	M	4 year 6 m	1 year 4 m	Y	Y	Y	N	Y	Y
3	M	2 year 10 m	1 year 3 m	Y	Y	Y	N	N	Y
4	M	4 year 9 m	1 year 6 m	Y	Y	Y	Y	Y	Y
5	M	4 year 11 m	2 year 6 m	Y	Y	Y	Y	Y	Y
6	M	6 year	3 year 6 m	Y	N	Y	N	N	Y
7	F	5 year 10 m	3 year 7 m	Y	Y	Y	Y	Y	Y
8	M	3 year 7 m	1 year 4 m	Y	N	Y	N	N	Y
9	M	3 year 5 m	1 year 5 m	Y	Y	Y	N	N	Y
10	M	4 year 6 m	2 year 7 m	Y	Y	Y	Y	Y	Y
11	M	3 year 2 m	1 year 4 m	Y	Y	Y	N	N	Y
12	F	5 year 5 m	3 year 4 m	Y	Y	Y	Y	Y	Y

F, female; M, male; m, month; Y, yes; N, no.

Clinical analysis by CARS and ABAS-3

The participants showed a significant difference in the CARS (Figure 2A, $P=0.002$), after the intervention with Marine *Schizochytrium* sp. Oil and Multi-Vitamin & Mineral complex, with decreased values in comparison to the moment before the use of the products. Also, in the ABAS-3 assessment, it was possible to verify that GAC (General Adaptive Composite Domain; Figure 2B, $P=0.003$) and social domain (Figure 2D, $P=0.005$) were statistically significant in comparison to before-after treatment. Conceptual (Figure 2C, $P=0.112$) and practical (Figure 2E, $P=0.075$) domains were not statistically altered.

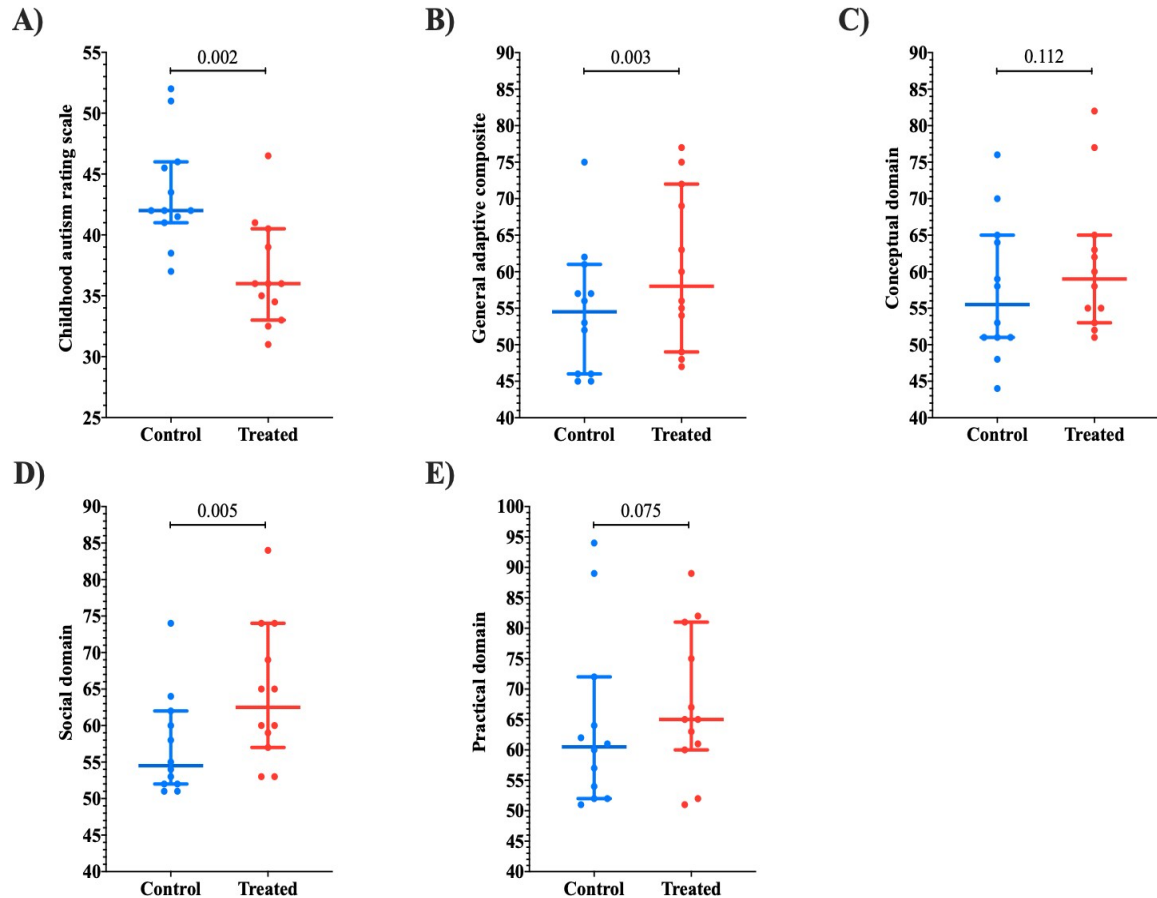


Figure 2. Response to the treatment with Marine *Schizochytrium* sp. oil and Multi-Vitamin & Mineral complex of participants with autism spectrum disorder evaluated by Adaptive Behavior Assessment System Third Edition (ABAS-3) scale. A) Childhood Autism Rating Scale; B) General Adaptive Composite Domain; C) Conceptual domain; D) Social domain; E) Practical domain. Data are presented by median and 95% confidence interval. Wilcoxon matched-pairs signed-rank test indicated the statistical difference between before-after treatment, considering an alpha error of 0.05.

When analyzed individually, it was possible to see that all the participants had a reduction in the CARS, justifying the statistical significance (Figure 3A). GAC revealed that only one participant did not change the score, while others improved (Figure 3B). Regarding the social

domain (Figure 3D), one participant had no improvement, and others did, being one participant with a score increase of 30 points. Other parameters conceptual and practical domains, did not present statistical significance in groups. Still, when participants were analyzed individually (Figures 3C and 3E, respectively), it is possible to see that the score was increased for most of them, being highly decreased on only one participant, which justifies the higher *P-value*.

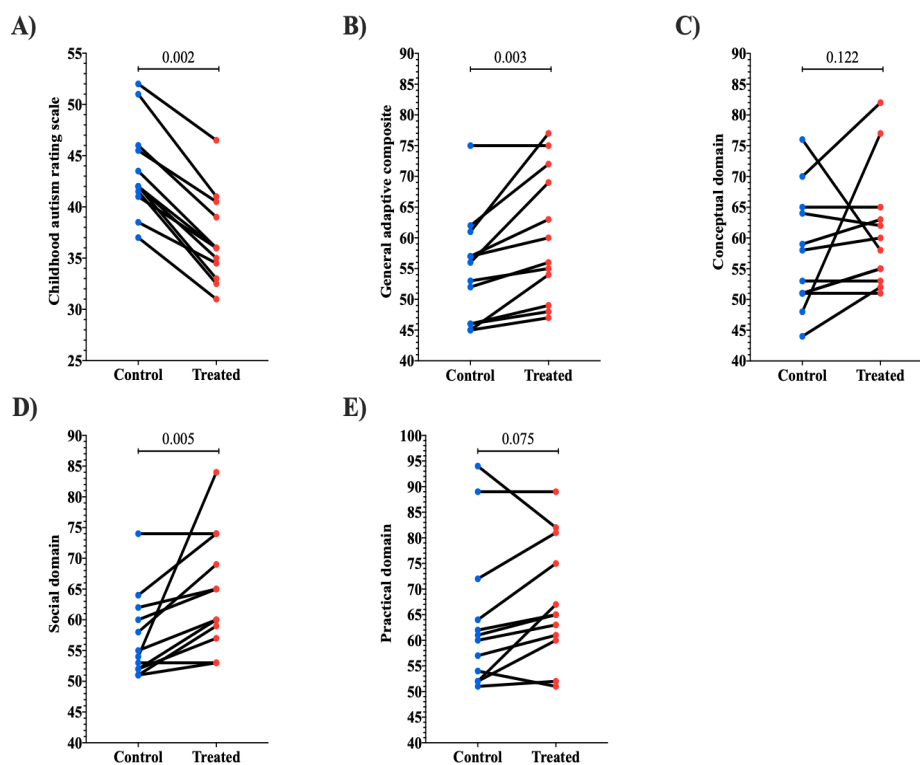


Figure 3. Response to the treatment with Marine *Schizochytrium* sp. oil and Multi-Vitamin & Mineral complex of participants with autism spectrum disorder evaluated by Adaptive Behavior Assessment System Third Edition (ABAS-3) scale. A) Childhood Autism Rating Scale; B) General Adaptive Composite Domain; C) Conceptual Domain; D) Social Domain; E) Practical Domain. Data are shown by raw data and pairing between before-after 12 weeks of treatment. The statistical analysis applied was a Wilcoxon matched-pairs signed-rank test that indicated the statistical difference between before and after treatment, considering an alpha error of 0.05.

Total antioxidant capacity of urine

The total antioxidant capacity of urine was determined in both groups, and a statistically significant increase was observed after the treatment compared to urine before the beginning of the study (Figure 4).

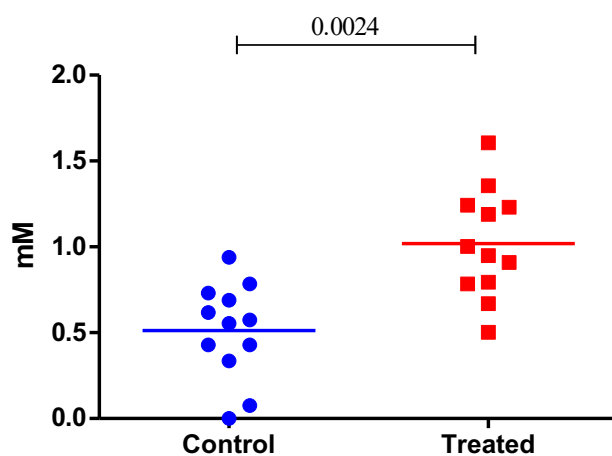


Figure 4. Total antioxidant capacity of urine of participants with autism spectrum disorder after the treatment with Marine *Schizochytrium* sp. oil and Multi-Vitamin & Mineral complex. The statistical analysis applied was a Wilcoxon matched-pairs signed-rank test that indicated the statistical difference between before-after treatment, considering an alpha error of 0.05.

Urine metabolites

In an untargeted search, the urine, when analyzed by mass spectrometry, presented differences between before-after treatment with Marine *Schizochytrium* sp. oil and Multi-Vitamin & Mineral complex for 12 weeks.

The identified molecules with statistical differences are shown in Table 3, which all increased with the treatment. It was possible to identify amino acids in free and dipeptide forms and compounds related to amino acid metabolism, such as succinylacetoacetate.

Table 3. Compound identification and statistically different between before-after the treatment with Marine *Schizochytrium* sp. oil and Multi-Vitamin & Mineral complex.

Description	Formula	Score	Mass Error (ppm)	m/z	Retention time (min)	ANOVA (P)
1-Methyl-6-phenyl-1H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-amine	C ₁₃ H ₁₂ N ₄	40	4.53	266.1410	4.90	0.0012
2-Deoxystreptamine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	38.2	-0.96	185.0895	3.78	0.0319
3-Mercaptolactic acid	C ₃ H ₆ O ₃ S	39.6	2.91	123.0113	4.80	0.0269
5-Hydroxylysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₃	40.6	0.96	185.0895	3.78	0.0319
Capillin	C ₁₂ H ₈ O	37.6	0.86	151.0544	4.25	0.0299
Cinnamyl cinnamate	C ₁₈ H ₁₆ O ₂	38.1	3.25	265.1231	4.93	0.0162
Ethyl aconitate	C ₈ H ₁₀ O ₆	37.9	3.56	225.0377	5.62	0.0398
Methionyl-Proline	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	36.8	3.01	247.1118	4.93	0.0144
N-Propionylmethionine	C ₈ H ₁₅ NO ₃ S	37.4	4.88	188.0750	4.61	0.0483
Prolyl-Methionine	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	30.8	3.01	247.1118	4.93	0.0144
Succinylacetoacetate	C ₈ H ₁₀ O ₆	37.7	3.56	225.0377	5.62	0.0398

Discussion

ASD is a complex neurodevelopmental disease characterized by multiple conditions, including deficits in communication and social interaction and specific patterns of behavior, such as repetitive activities. Other diseases can be observed in patients with ASD, such as epilepsy and immune dysfunction. Due to that, epileptic participants were excluded from the study (APA, 2014).

Recently, research was focused on neural development and synaptic plasticity to understand and propose new treatments for ASD; in addition, the immune condition has been widely studied, including oxidative stress in an important role in disease development (Pangrazzi

et al., 2020).

A study showed that children seem more vulnerable to oxidative stress than older kids due to their inefficient antioxidant mechanisms. Thus, the supplementation of antioxidants in younger children would surpass this unbalance by scavenging these free radicals (Schiavone et al., 2015).

Since chronic exposure to ROS can cause neuroinflammation and neuron damage, oxidative stress prevention would impair irreversible brain damage, and exogenous antioxidants may have this role in patients with ASD (Popa-Wagner et al., 2013). We observed here that the total antioxidant capacity of urine was increased after the treatment, reinforcing the antioxidant effect of DHA and vitamins/minerals and appropriate intake.

In fact, clinical trials have shown that patients with ASD improved their skills in administering antioxidants. Coenzyme Q10 improved communication in children, both restricted and overall (Mousavinejad et al., 2018). N-acetylcysteine also caused improvement in irritability and stereotypical behavior after 8 weeks of treatment (Hardan et al., 2012).

Vitamins were also evaluated in patients with ASD: vitamin C caused improvement in sensorimotor behavior when administered by 30 weeks (Pangrazzi et al., 2020). Seventy-three ASD children (2.5-8.0 y.o.) were evaluated in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial using vitamin D (2,000 IU/day) and DHA (722 mg/day). They caused improvement in the Social Responsiveness Scale-awareness and modulation of the inflammatory response (Mazahery et al., 2020).

A recent study showed that 54 children with ASD, evaluated in a double-blind and randomized clinical trial, improved stereotyped behaviors and social communication after the daily use of 1,000 mg of omega-3 (Doaei et al., 2021). A 16-month study with 377 children was conducted, and the administration of 200 mg DHA and 200 mg arachidonic acid vs. placebo caused an increase in the Pervasive Developmental Disorders Screening Test-II, Stage 2 (Boone et al., 2020).

Torre-Aguilar evaluated the administration of fatty acids (800 mg/day DHA and 25 mg/day EPA) on patients with (2-6 y.o.) for six months and compared to a placebo group. They found that using CARS-2, there was no significant change between groups, but comparing the baseline to the treatment group's final intervention, a significant reduction in the score was observed (Bacila et

al., 2015).

Voight et al. (2014) supplemented ASD children with 200 mg/day DHA for 6 months and did not see any improvement in symptoms and attributed to the inadequate sample size. In the same way, Politi et al. (2008) related no findings with the administration of omega-3 FA in young adults with severe autism and attributed to the small sample.

Although the use of omega and vitamins has been widely studied, our study is the first one that combines DHA and vitamins/minerals complex. The variation among children was the cause of the divergent results observed in clinical trials and also observed here. Some ABAS-3 scale domains had no statistical significance due to the low homogeneity of data. Moreover, scores for both initial and ending time for several domains are different between individuals, making us choose the case series trial, not randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial. Finally, including a placebo group would require higher recruitment of patients and consequently a high dropout rate, or even discontinuous intake of supplements, which would make the results inconclusive. This may happen in some published clinical trials, in which no alteration in the patient's behavior with omega-3 or vitamin use is observed. It is essential to mention that ASD children have several difficulties in their food intake since taste to food aspect is a challenge to administer products in such patients and have warranties of engagement in a clinical trial.

By analyzing these ABAS-3 parameters, it was possible to quantify aspects qualitatively observed by the children's parents and pediatricians, especially those related to communication, visual contact interaction, feeding, and food selectivity, considered essential for the insertion of such patients in society and improving their quality of life.

On the other hand, we obtained satisfactory indices on the ABAS-3 scale, which assesses individuals in terms of adaptive functionality, general behavior, social communication, and unusual behavior, allowing for the monitoring of patients and improvement of these symptoms, when periodically reapplied, with their standard scores referenced by numbers, the confidence interval for standard scores and classification of percentiles, using the scale's tables to classify them later descriptively and categorically into extremely low, low, below average, medium, above average, and high (Oakland; Harrison, 2008).

Adaptive functioning refers to how well a person meets the standards of their community

in terms of personal independence and social responsibility compared to others of similar age and sociocultural background, involving adaptive reasoning in three domains: conceptual, social, and practical the GAC is the sum of these three domains (APA, 2014).

Our study showed a significant improvement in the social domain and GAC; the first one involves the perception of thoughts, feelings, and experiences of others, in addition to empathy, interpersonal communication skills, friendship skills, and social justice, which is consistent with the qualitative observations obtained from the parents and caregivers, who noticed that communication and interaction with people and the environment had a good evolution. GAC is a general classification of the individual's functioning, as it considers all the evaluated domains, making it more explicit that the perception of parents and caregivers may not be wrong since, in the 12 participants, there were reports of a favorable development globally.

The presence of amino acids in the urine was detected. 5-Hydroxylysine has been found to reduce in ASD untreated patients, compared to healthy patients, and the treatment with probiotics and nutritional supplements increased the concentration in urine (Evans et al., 2008). Here we observed a similar result – 5-Hydroxylysine was increased after intervention with Marine Schizochytrium sp. oil and Multi-Vitamin & Mineral complex. This amino acid is present in collagen and enables the formation of cross-links and carbohydrates attachment, and then has importance in the extracellular matrix and bone/connective tissue, and other physiological functions, such as cell-cell signaling, adhesion, migration, and cell differentiation (Gjaltema; Bank, 2017).

The dipeptide methionyl-proline or prolyl-methionine, not differentiated by mass spectrometry, was detected. Dipeptides involving these two amino acids have never been related to ASD; however, proline has been found to decrease in the urine of children with ASD, and the treatment with food supplements could restore the level of the amino acid, as observed here (Zheng et al., 2017).

Conclusion

This clinical trial showed favorable results concerning skills development in children's participants with ASD who used Marine *Schizochytrium* sp. oil and Multi-Vitamin & Mineral complex, by their antioxidant effect and amino acids balance. We observed not only qualitative results but could quantify parameters that statistically changed after the use of the product.

It is important to point out that using such supplements is a cheaper and easier choice for patients with ASD, who have high food selectivity and find it challenging to take all kinds of medicine.

We believe that using Marine *Schizochytrium* sp. oil) and Multi-Vitamin & Mineral complex, especially at an earlier stage, maybe possible for adjuvant therapy as it becomes more evident every day how antioxidant and anti-inflammatory molecules can help in the condition.

References

APA 2014. A. P. A. DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais.[s.l.] Artmed Editora.

Bacila EDA, Júnior OM, Rechb, CR, Legnania, FRS, Campos W, 2015. Atividade física e maturação biológica: uma revisão sistemática. Revista Paulista de Pediatria, 33(1), 114–121.

Barnard-Brak L, Richman DM, Chesnut SR, Little TD, 2016. Social Communication Questionnaire scoring procedures for autism spectrum disorder and the prevalence of potential social communication disorder in ASD. Sch Psychol Q. 31, 522–533.

Bianchi MLP, Antunes LMG, 1999. Radicais Livres E Os Principais Antioxidantes Da Dieta. Free Radicals And The Main Dietary Antioxidants. Rev.Nutrição, v. 12, n. 2, 123-130. Bjørklund, G., Meguid, N.A., El-Bana, M.A. et al. 2020. Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. Mol Neurobiol 57, 2314–2332.

Boone KM, Parrott A, Rausch J, Yeates KO, Klebanoff MA, Turner AN, Keim SA, 2020. Fatty Acid Supplementation and Socioemotional Outcomes: Secondary Analysis of a Randomized Trial. Pediatrics. 146(4).

- Djuricic I, Calder PC, 2021. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients*. 13(7), 2421.
- Doaei S, Bourbour F, Teymoori Z, Jafari F, Kalantari N, Torki SA, Ashoori N, Gorgani SN, Gholamalizadeh M, 2021. The effect of omega-3 fatty acids supplementation on social and behavioral disorders of children with autism: a randomized clinical trial. *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism*. 27(1), 12–18.
- Emam MM, Al-Sulaimani H, Omara E, Al-Nabhany R, 2019. Assessment of adaptive behaviour in children with intellectual disability in Oman: an examination of ABAS-3 factor structure and validation in the Arab context. *International Journal of Developmental Disabilities*. 66(4), 317–326.
- Evans C, Dunstan RH, Rothkirch T, Roberts TK, Reichelt KL, 2008. Cosford, R.; Deed, G.; Ellis, L.B.; Sparkes, D.L. Altered amino acid excretion in children with autism. *Nutritional Neuroscience*. 11(1), 9-17
- Ferreira RMA, Fernandes PLO, Fontes LO, Rodrigues APMS, Silva LT, 2010. Antioxidantes e Sua Importância Na Alimentação. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa*. 5(5), 26-30.
- Ghezzi P. 2011. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *Int. J. Gen.Med*. 4, 105–113.
- Gjaltema RAF, Bank RA, 2017. Molecular insights into prolyl and lysyl hydroxylation of fibrillar collagens in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 52(1), 74-95.
- Hardan AY, Fung LK, Libove RA, Obukhanych TV, Nair S, Herzenberg LA, Frazier TW, Tirouvanziam R, 2012. A Randomized Controlled Pilot Trial of Oral N-Acetylcysteine in Children With Autism. *Biol Psychiatry*. 71(11), 956-61.
- Hsieh HL, Yang CM, 2013. Role of Redox Signaling in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. *BioMed Res. Int*. 1–18.
- Kaat A, Lecavalier L, 2021. Childhood Autism Rating Scale. In: *Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders*. Cham: Springer International Publishing. 895–898.

- Kim HY, Huang BX, Spector AA, 2022. Molecular and Signaling Mechanisms for Docosahexaenoic Acid-Derived Neurodevelopment and Neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(9), 4635.
- Liu Y, Yang Z, Du Y, Shi S, Cheng Y, 2022. Antioxidant interventions in autism spectrum disorders: A meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 113, 110476.
- Manivasagam T, Arunadevi S, Essa MM, Saravanababu C, Borah A, Thenmozhi AJ, Qoronfle MW, 2020. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Autism. *Adv. Neurobiol.* 24, 193–206.
- Mazahery H, Colon CA, Beck KL, Mugridge O, Kruger MC, Stonehouse W, Camargo JCA, Meyer BA, Tsang BJ, von Hurst PR, 2020. Inflammation (IL-1 β) Modifies the Effect of Vitamin D and Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids on Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder—An Exploratory Pilot Study. *Nutrients*. 12(3), 661.
- Mousavinejad E, et al, 2018 Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activity in children with autism spectrum disorders. *Psychiatry Research*. 265, 62–69
- Oakland T, Harrison, PL, 2008. Adaptive Behavior Assessment System-II: Clinical Use and Interpretation. [s.l.] Academic Press.
- Pangrazzi, L, Balasco, L, Bozzi, Y, 2020. Natural Antioxidants: A Novel Therapeutic Approach to Autism Spectrum Disorders *Antioxidants*. 9, 1186.
- Pangrazzi L, Balasco L, Bozzi Y, 2020a. Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(9), 3293
- Pereira A, Riesgo RS, Wagner MB, 2008. Autismo infantil: tradução e validação da Childhood Autism Rating Scale para uso no Brasil. *Jornal de Pediatria*. 84(6), 487–494.
- Politi P, Cena H, Comelli M, Marrone G, Allegri C, Emanuele E, Nemi SU, 2008. Behavioral Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation in Young Adults with Severe Autism: An Open Label Study. *Archives of Medical Research*. 39(7), 682–685.
- Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga AM, 2013. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1–14.

- Reboul E, Thap S, Perrot E, Amiot MJ, Lairon D, Borel P, 2007. Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, c-tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on a-tocopherol absorption. *European Journal of Clinical Nutrition*. 61, 1167–1173.
- Rose S, Melnyk S, Pavliv O, Bai S, Nick TG, E Frye R, James SJ, 2012. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. *Transl. Psychiatry*. 2, 134.
- Saini RK, Keum YS, 2018. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance—A review. *Life Sci*. 203, 255–267.
- Saini RK, Prasad P, Sreedhar RV Naidu KA, Shang X, Keum YS, 2021. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Emerging Plant and Microbial Sources, Oxidative Stability, Bioavailability, and Health Benefits—A Review. *Antioxidants*. 10(10), 1627.
- Salem N, Litman B, Kim HY, Gawrisch K, 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*. 36, 945–959
- Salzano S, Checconi P, Hanschman EM, Lillig CH, Bowler LD, Chan P, Vaudry H, Mengozzi M, Coppo L, Sacre S, et al, 2014. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 111, 12157–12162.
- Sanchack KE, Thomas CA, 2016. Autism spectrum disorder: primary care principles. *Am Fam Physician*. 94, 972–979.
- Schiavone S, Colaianna M, Curtis L, 2015. Impact of Early Life Stress on the Pathogenesis of Mental Disorders: Relation to Brain Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*. 21(11), 1404–1412.
- Söğüt S, Zoroğlu SS, Özyurt H, Yılmaz HR, Özüğurlu F, Sivaslı E, Yetkin Ö, Yanık M et al, 2003. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta*. 331, 111–117.
- Voigt RG, Mellon MW, Katusic SK, Weaver AL, Matern D, Mellon B, Jensen CL, Barbaresi WJ, 2014. Dietary Docosahexaenoic Acid Supplementation in Children With Autism. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 58(6), 715–722.

Zheng HF, Wang W, Li X, Rauw G, Baker G, 2017. Body fluid levels of neuroactive amino acids in autism spectrum disorders: a review of the literature. *Amino Acids*. 57–65.

4. Conclusão

O Transtorno do Espectro Autista tem sido amplamente divulgado devido ao grande impacto que provoca tanto nos indivíduos que recebem o diagnóstico como nas suas famílias e meios de convivência, ainda sem uma fisiopatologia bem estabelecida e sendo principalmente causa multifatorial, os estudos têm se voltado a estabelecer maneiras de realizar diagnóstico precoce, assim como elucidar a patogênese para que então pudesse intervir de forma mais efetiva.

A associação do TEA com estresse oxidativo vem sendo comprovada em diversas publicações, assim, fontes externas de antioxidantes têm sido estudadas, a fim de restaurar o sistema de eliminação de EROs e então neutralizar o estresse oxidativo. No entanto, muitos resultados são conflitantes em literatura, provavelmente pelo desenho do estudo clínico, falta de padronização das amostras, relação ao tipo de substância utilizada, dose e tempo de tratamento.

Os nossos resultados mostraram-se promissores em relação ao desenvolvimento dos participantes com TEA, provavelmente pelo seu efeito antioxidante e equilíbrio de aminoácidos. Observamos resultados significativos do ponto de vista qualitativo e quantitativo, com mudanças estatísticas após uso dos produtos. A dificuldade de adesão ao tratamento, tanto por questões comportamentais quanto pela seletividade alimentar, é uma barreira importante a se considerar, o que nos levou a escolher o tipo de estudo comparativo (antes e após o tratamento), e isso nos permitiu a inclusão de um número menor de pacientes.

Foi possível notar melhora significativa de diversos aspectos, o que impactou positivamente na qualidade de vida tanto das crianças quanto das famílias.

Desta forma, acreditamos que o uso do óleo de alga marinha *Schizochytrium* sp e complexo multivitamínico/mineral, especialmente em um estágio inicial, deve ser considerado para terapia adjuvante, pois fica mais evidente a cada dia como as moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias podem ajudar na condição.

5. Referências Bibliográficas

AHMAD, S. F. et al. Resveratrol attenuates pro-inflammatory cytokines and activation of JAK1-STAT3 in BTBR T + Itpr3^{tf/J} autistic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 829, p. 70–78, jun. 2018.

(APA), A. P. A. **DSM-5: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. [s.l.] Artmed Editora, 2014.

BJØRKLUND, G. et al. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 76, n. 4, p. 257–268, 2016.

BJØRKLUND, G. et al. Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2314–2332, 5 fev. 2020.

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

CDC. **Data and Statistics on Autism Spectrum Disorder**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

CHEN, L. et al. 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. 1, 5 jan. 2021.

DIAS, S. Asperger e sua síndrome em 1944 e na atualidade. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 18, n. 2, p. 307–313, jun. 2015.

DJURICIC, I.; CALDER, P. C. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2421, 15 jul. 2021.

FARAH, R. et al. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. **Biomedical Journal**, v. 41, n. 2, p. 63–87, abr. 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, mar. 1997.

- GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 83–94, abr. 2004.
- GESCHWIND, D. H.; STATE, M. W. Gene hunting in autism spectrum disorder: on the path to precision medicine. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 11, p. 1109–1120, nov. 2015.
- GHEZZI, P. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. **International Journal of General Medicine**, p. 105, jan. 2011.
- GVOZDJÁKOVÁ, A. et al. Ubiquinol Improves Symptoms in Children with Autism. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–6, 2014.
- HICKS, S. D. et al. Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. **BMC Pediatrics**, v. 16, n. 1, 22 abr. 2016.
- HARDAN, A. Y. et al. A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. **Biol Psychiatry**. v.71, n. 11, p. 956-61, 2012.
- HODGES, H.; FEALKO, C.; SOARES, N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. **Translational Pediatrics**, v. 9, n. S1, p. S55–S65, fev. 2020.
- KERN, J. K. et al. Evidence of neurodegeneration in autism spectrum disorder. **Translational Neurodegeneration**, v. 2, n. 1, 8 ago. 2013.
- LIU, Z. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–11, 2017.
- LIU, Y. et al. Antioxidant interventions in autism spectrum disorders: A meta-analysis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 113, p. 110476, mar. 2022.
- LOOMES, R.; HULL, L.; MANDY, W. P. L. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 56, n. 6, p. 466–474, jun. 2017.
- MANIVASAGAM, T. et al. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Autism. In: **Advances in Neurobiology**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 193–206.
- 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, 17 mar. 2017.

PANGRAZZI, L.; BALASCO, L.; BOZZI, Y. Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3293, 6 maio 2020.

PANGRAZZI, L.; BALASCO, L.; BOZZI, Y. Natural Antioxidants: A Novel Therapeutic Approach to Autism Spectrum Disorders? **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1186, 26 nov. 2020.

PARDO, C. A.; VARGAS, D. L.; ZIMMERMAN, A. W. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. **International Review of Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 485–495, jan. 2005.

PARK, D. I. Genomics, transcriptomics, proteomics and big data analysis in the discovery of new diagnostic markers and targets for therapy development. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 61–90.

PATEL, A. et al. Bioprospecting of thraus-tochytrids for omega-3 fatty acids: A sustainable approach to reduce dependency on animal sources. **Trends Food Sci. Technol.** v 115, p. 433-444, 2021.

RAHAL, A. et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–19, 2014.

REICHELT, K. L.; KNIVSBERG, A.-M. The possibility and probability of a gut-to-brain connection in autism. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 21, p. 205-211, 2009.

ROCHA, C. C. et al. O perfil da população infantil com suspeita de diagnóstico de transtorno do espectro autista atendida por um Centro Especializado em Reabilitação de uma cidade do Sul do Brasil. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 29, n. 4, 2019.

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. Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: a systematic review. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 213–236, out. 2009.

RUSSO, G. L. et al. Sustainable production of food grade omega-3 oil using aquatic protists: Reliability and future horizons. **New Biotechnol.** 2021, 62, 32–39.

- RUTIGLIANO, G. et al. Peripheral oxytocin and vasopressin: Biomarkers of psychiatric disorders? A comprehensive systematic review and preliminary meta-analysis. **Psychiatry Research**, v. 241, p. 207–220, jul. 2016.
- SAINI, R. K et al. Omega–3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Emerging Plant and Microbial Sources, Oxidative Stability, Bioavailability, and Health Benefits—A Review. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1627, out. 2021.
- SALZANO, S. et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 33, p. 12157–12162, 5 ago. 2014.
- SANDIN, S. et al. The Familial Risk of Autism. **JAMA**, v. 311, n. 17, p. 1770, 7 maio 2014.
- SCHOPLER, E.; REICHLER, R.; RENNER, B. **The Childhood Autism Rating Scale (CARS)**. Los Angeles: Western Psychological Services, 1988.
- SILVA, L. T. et al. The Dark Side of Microalgae Biotechnology: A Heterotrophic Biorefinery Platform Directed to ω -3 Rich Lipid Production. **Microorganisms**, v. 7, p. 670, 2019.
- SZTAINBERG, Y.; ZOGHBI, H. Y. Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 1408–1417, 26 out. 2016.
- TALIOU, A. et al. An Open-Label Pilot Study of a Formulation Containing the Anti-Inflammatory Flavonoid Luteolin and Its Effects on Behavior in Children With Autism Spectrum Disorders. **Clinical Therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 592–602, maio 2013.
- VERHOEFF, B. Autism in flux: a history of the concept from Leo Kanner to DSM-5. **History of Psychiatry**, v. 24, n. 4, p. 442–458, 18 nov. 2013.
- VESELINOVIĆ, A. et al. Neuroinflammation in Autism and Supplementation Based on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Narrative Review. **Medicina**, v. 57, n. 9, p. 893, 28 ago. 2021.
- WING, L. Reflections on Opening Pandora’s Box. In: **Journal of Autism and Developmental Disorders**. New York, NY: Springer Publishing Company, 2005. p. 197–203.
- WINK, L. K. et al. A randomized placebo-controlled pilot study of N-acetylcysteine in youth with autism spectrum disorder. **Molecular Autism**, v. 7, n. 1, 21 abr. 2016.

XIE, W. et al. Resveratrol ameliorates prenatal progestin exposure-induced autism-like behavior through ER β activation. **Molecular Autism**, v. 9, n. 1, 2 ago. 2018.

ZIATS, C. A.; PATTERSON, W. G.; FRIEZ, M. Syndromic Autism Revisited: Review of the Literature and Lessons Learned. **Pediatric Neurology**, v. 114, p. 21–25, jan. 2021.