



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA CLÍNICA

QUEZIA DAMARIS JONES SEVERINO VASCONCELOS

**USO DE WHEY PROTEIN PARA TRATAR DISBIOSE DE RATOS WISTAR COM
SINTOMAS DE AUTISMO INDUZIDOS POR ÁCIDO VALPROICO**

FORTALEZA/CE

2022

QUEZIA DAMARIS JONES SEVERINO VASCONCELOS

USO DE WHEY PROTEIN PARA TRATAR DISBIOSE DE RATOS WISTAR COM
SINTOMAS DE AUTISMO INDUZIDOS POR ÁCIDO VALPROICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão.
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Marisa Jadna Silva Frederico.

FORTALEZA/CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

V451u Vasconcelos, Quezia Damaris Jones Severino.
Uso de whey protein para tratar disbiose de ratos wistar com sintomas de autismo induzidos por ácidovalproico / Quezia Damaris Jones Severino Vasconcelos. – 2022.
72 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão.

Coorientação: Profa. Dra. Marisa Jadna Silva
Frederico.

1. Whey protein. 2. Disbiose. 3. Autismo. 4. Experimental. I. Título.

CDD 615.1

QUEZIA DAMARIS JONES SEVERINO VASCONCELOS

USO DE WHEY PROTEIN PARA TRATAR DISBIOSE DE RATOS WISTAR COM
SINTOMAS DE AUTISMO INDUZIDOS POR ÁCIDO VALPROICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia Clínica.

Aprovada em: 03/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^ª. Dr^ª. Sandra Maria Nunes Monteiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Centro Universitário CHRISTUS (UNICHRISTUS)

A Deus, que me guia e me conduz, a ele toda glória e honra.

Aos meus pais e família, por sempre acreditarem em mim e apoiarem meus sonhos, por sempre terem me propiciado todos os meios para que eu pudesse concluir esse mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o condutor dos meus caminhos, ter me ajudado a passar pelos momentos difíceis e árduos, por ter colocado na minha vida pessoas incríveis que contribuíram em muito para a realização desse trabalho.

A minha família, em especial aos meus pais, João Batista Carneiro de Vasconcelos e Marcleide Severino de Vasconcelos, por seus ensinamentos e nunca terem medido esforços para me auxiliar nessa jornada. A meus irmãos, por terem contribuído em muito comigo para que eu pudesse concluir esse trabalho perfeitamente. A todos, agradeço pelo amor que sentem por mim, sou grata a tudo que sou e tudo que conseguir conquistar e pela felicidade que tenho.

A meu orientador, Prof. Dr. Gislei Frota Aragão, por sua confiança em mim, por sua orientação, paciência e dedicação. Muito obrigada pelos ensinamentos compartilhados, por me ajudar a alcançar todo meu potencial acadêmico, quando algumas vezes nem eu mesma acreditava ser possível.

A minha coorientadora, Prof^ª. Dr^ª. Marisa Jadna Silva Frederico, pela ajuda e por ter participado nas ideias iniciais desse trabalho. Muito obrigada por toda sua colaboração, explicações, tempo e recursos fornecidos para concretização dessa pesquisa.

Ao laboratório de análises clínicas e toxicológicas (LACT/UFC), em particular a Prof^ª. Dr^ª. Renata de Sousa Alves, por tonarem possível a execução das análises bioquímicas e hematológicas, as quais contribuíram em muito para a relevância desse trabalho. Muito obrigada.

Aos meus colegas de grupo de estudo (GENIT/UECE), em especial a Dara Mesquita, pelo apoio nos testes comportamentais. Agradeço também a Dr^ª. Gabriela Mariângela Farias de Oliveira, pela imensa ajuda dada com a experimentação animal, o qual os esforços e auxílio foram essenciais para efetuação desse trabalho. Sei que posso contar sempre com a amizade, auxílio e assistência de ambas para tudo. Obrigada.

Por último, agradeço aos professores membros da banca, Prof^ª. Dr^ª. Sandra Maria Nunes Monteiro e Prof^ª. Dr^ª. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, por gentilmente aceitarem o convite de participar da avaliação dessa dissertação. Em especial a Prof^ª. Tereza, que sem sua imensa ajuda nas análises microbiológicas, essa parte importantíssima da pesquisa não teria sido realizada. Muito obrigada pelos recursos físicos, seu precioso tempo e explicações para que eu pudesse atingir tudo o que me fosse possível nesse trabalho.

RESUMO

Uma grande parte das crianças com o transtorno do espectro autista (TEA) apresentam um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal que pode agravar sintomas comportamentais. O uso da proteína do soro do leite (*whey protein*) está associada a regeneração da barreira intestinal e recuperação da microbiota, podendo influenciar no neurodesenvolvimento. O ácido valproico (VPA) é uma droga teratogênica capaz de induzir características 'autísticas' e disbiose. Portanto, o presente estudo tem por finalidade avaliar a suplementação de *whey protein* (1,24 mg/g - 24 dias) na disbiose intestinal e padrões comportamentais em ratos tratados com VPA (400 mg/kg - dose única). Foram usados ratos Wistar jovens com 14 dias de nascimento (42 machos e 35 fêmeas) sendo divididos nos seguintes grupos: controle, TEA, *whey protein* com TEA e *whey protein*. Ao término do tratamento os animais foram submetidos aos testes de campo aberto, interação social, *Y-maze* e *marble burying*, posteriormente, o sangue e intestino grosso contendo as fezes foram retirados para análises. A eutanásia foi feita por anestesia seguida de exsanguinação. Os resultados demonstraram que a suplementação proteica não foi capaz de reverter a perda de peso, diminuição de proteínas plasmáticas, ácido úrico, HDL-c, bilirrubina indireta e alterações hematológicas provocadas pelo VPA ($p > 0,05$). Entretanto, o suplemento aumentou a quantidade de colônias e diversidade bacteriana encontrada nos animais ($p < 0,05$), e também influenciou na composição da microbiota, com predomínio de bactérias do filo Firmicutes nos grupos suplementados. Além disso, melhorou a memória dos animais, pois aumentou a porcentagem alternância entre os braços e diminuiu o retorno ao braço, macho e fêmea, respectivamente. O *whey protein* também foi capaz de atenuar o tempo que o animal passou na câmara sozinho, melhorando, em parte, a sociabilidade ($p < 0,05$). Desse modo, o tratamento com *whey protein* (1,24 mg/g - 24 dias) teve influência positiva na microbiota intestinal, além de melhorar a sociabilidade e memória dos animais.

Palavras-chave: Whey Protein. Disbiose. Autismo. Experimental.

ABSTRACT

A great number of children with autism spectrum disorder (ASD) have a disproportionate gut microbiota composition which may worsen behavioral outcomes. Whey protein supplementation is associated with gut barrier regeneration and microbiota recovery, which might interfere in the neurodevelopment. Valproic acid (VPA) is a teratogenic drug capable of promoting 'autistic' features and dysbiosis. Therefore, the present study aims to evaluate the benefits of whey protein supplementation (1.24 mg/g - 24 days) in rats treated with VPA (400 mg/kg - single dose) regarding behavioral outcomes and dysbiosis. Young Wistar rats 14 days old were used (42 males and 35 females) and divided into four groups: control, ASD, whey protein with ASD and whey protein. At the end of the treatment, the pups were evaluated in the open field, social interaction, Y-maze, and marble burying tests, subsequently, the blood and the large intestine containing faeces were collected for analysis. Euthanasia was performed by anesthesia followed by exsanguination. The results showed that protein supplementation did not reverse weight loss, the decrease of plasma proteins, uric acid, HDL-c, and indirect bilirubin, along with blood alterations caused by VPA ($p > 0.05$). However, the supplement increased bacteria diversity and number of colonies in the animals' faeces ($p < 0.05$), it also influenced microbiota composition, since bacteria from the Firmicutes phylum were found, predominantly, in the supplemented groups. In addition, improved the animal's memory, as increased the percentage of arms alternation and decreased the return to the same arm, male and female, respectively. Whey protein was also able to decrease the time that the animal spent in the 'alone chamber', partially improving sociability ($p < 0.05$). Thus, whey protein treatment (1.24 mg/g - 24 days) positively influenced the gut microbiota, along with the animal's sociability and memory.

Keywords: Whey protein. Dysbiosis. Autism. Experimental.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Disbiose.....	17
Figura 2 – Eixo cérebro-intestino.....	18
Figura 3 – Papel da microbiota intestinal no TEA.....	20
Figura 4 – Desenho experimental do projeto.....	24
Figura 5 – Divisão dos grupos.....	24
Figura 6 – Teste campo aberto.....	28
Figura 7 – Teste <i>Y-maze</i>	29
Figura 8 – Teste interação social.....	30
Figura 9 – Teste <i>marble burying</i>	31
Figura 10 – (A) Peso corporal dos animais machos antes do tratamento. (B) Evolução de peso dos grupos. (C) Comparação do ganho de peso entre os grupos.....	32
Figura 11 – (A) Peso corporal dos animais fêmeas antes do tratamento. (B) Evolução de peso dos grupos. (C) Comparação do ganho de peso entre os grupos.....	33
Figura 12 – Proteínas séricas. (A) Albumina (g/dl), (B) Globulina (U/L), (C) Proteínas totais (U/L).....	34
Figura 13 – Bilirrubina direta (mg/dl).....	35
Figura 14 – HDL-colesterol (mg/dl).....	35
Figura 15 – Ácido úrico (mg/dl).....	36
Figura 16 – Eritrograma (série vermelha). (A) Eritrócitos ($10^{12}/L$), (B) Hemoglobina (g/dL), (C) Hematócrito (%).....	37
Figura 17 – Número de vezes que retornou ao braço (fêmea).....	39
Figura 18 – Número de alternância entre os braços (macho).	39
Figura 19 – % Alternância entre os braços (macho).....	40
Figura 20 – Tempo gasto, em segundos, do animal teste na câmara com e sem o animal estranho.....	41
Figura 21 – Tempo gasto, em segundos, do animal teste na câmara sem o animal estranho (macho).....	41

Figura 22 – Quantidade total de colônias nos diferentes grupos U.F.C./g (log) (machos e fêmeas)..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado campo aberto.....	38
Tabela 2 – Resultado marble burying.....	41
Tabela 3 – Diversidade e quantidade (U.F.C./g) da microbiota encontrada nos diferentes grupos.....	43
Tabela 4 – Distribuição da microbiota quanto ao filo.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TEA	Transtorno do Espectro Autista
WP	Whey Protein
VPA	Ácido Valproico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGCR	Ácidos Graxos de Cadeira Ramificada
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
IL	Interleucina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alpha
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
UFC	Universidade Federal do Ceará
CEUA	Comitê de Ética e Pesquisa Animal
PND	Dia pós-natal
ADM	Administração
C	Grupo Controle
T	Grupo TEA
WT	Grupo WP com TEA
WP	Grupo WP
AACR	Aminoácidos de Cadeira Ramificada
DAE	Dose Animal Equivalente
ASA	Ágar-sangue
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i>
U.F.C.	Unidades Formadoras de Colônias
AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
HDL-c	<i>High density lipoprotein cholesterol</i>
LACT	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
α	Alpha
β	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Microbiota intestinal de humanos e disbiose	16
2.2 Eixo cérebro-intestino	17
2.3 Transtorno do Espectro Autista e microbiota intestinal	19
2.4 Proteínas solúveis do soro do leite de vaca e modulação intestinal	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Animais e aspectos éticos	24
4.2 Protocolo experimental	24
4.2.1 Grupos	24
4.2.2 Concentrações de ácido valproico e <i>whey protein</i>	26
4.2.3 Protocolo das vias de administração	26
4.2.4 Eutanásia e coleta do intestino grosso	27
4.2.5 Análise das bactérias	27
4.2.6 Doseamento bioquímico	28
4.2.7 Hemograma completo	28
4.3 Testes comportamentais	29
4.3.1 Teste do campo aberto	29
4.3.2 Teste <i>Y-maze</i>	29
4.3.3 Teste de interação social	30
4.3.4 Teste <i>marble burying</i>	31
4.4 Análises dos dados	32
5 RESULTADOS	24
5.1 Resultado ponderal	33
5.2 Resultados bioquímicos	35
5.3 Resultados hematológicos	37
5.4 Resultados comportamentais	39
5.4.1 Campo aberto	39
5.4.2 <i>Y-maze</i>	39

5.4.3 Interação social.....	41
5.4.4 <i>Marble burying</i>	43
5.5 Resultados microbiológicos	43
6 DISCUSSÃO	47
6.1 Efeitos no peso corporal.....	47
6.2 Efeitos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos	49
6.3 Efeitos comportamentais	50
6.4 Efeitos na microbiota intestinal	53
7 LIMITAÇÕES	56
8 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – Aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal	69

1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal se refere aos microrganismos presentes no trato gastrointestinal que vivem em um estado simbiótico com o organismo humano em que ambos se beneficiam, quando há alguma perturbação nesse estado pode ocorrer a disbiose e disfunção na mucosa intestinal com ativação do sistema imune e processos inflamatórios (WALKER, 2017; TIFFANY; BÄUMLER, 2019; ADAK; KHAN, 2019).

Pesquisas recentes demonstram que a disbiose, alterações na mucosa e microbiota intestinal são prevalentes em crianças com o transtorno do espectro autista (TEA) que podem tanto ser consequência como influenciada pela desordem (HUGHES; ROSE; ASHWOOD, 2018; MADRA; RINGEL; MARGOLIS, 2020). A etiologia do TEA ainda não está totalmente clara, porém modificações genéticas e questões ambientais estão relacionadas, dentre elas mudanças no padrão alimentar (ARBERAS; RUGGIERI, 2019; ADAMS *et al.*, 2011). A seletividade alimentar presente em crianças com TEA pode influenciar negativamente na composição da microbiota intestinal devido a uma ingestão diminuída ou inadequada de nutrientes. Por sua vez, uma microbiota intestinal desbalanceada contribuiria para alterações comportamentais e sistêmicas (DEMIR; ÖZCAN, 2022; YU; ZHAO, 2021).

O *whey protein* (WP) é comumente utilizado como fonte de suplementação de proteínas para o incremento de ações fisiológicas tais como atividade anti-inflamatória e imunomoduladora, e, também em diferentes condições clínicas como na desnutrição infantil justamente por possuírem um alto teor de aminoácidos essenciais (BUMRUNGPURT *et al.*, 2018; PICAUD, *et al.*, 2020; DALLAS *et al.*, 2017). O WP são as proteínas do soro do leite de vaca (porção aquosa) extraídas durante o processo de fabricação do queijo, seus componentes incluem: β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina, lactoferrina, imunoglobulinas, lactoperoxidase, glicomacropéptídeos, outros péptídeos bioativos e minerais (DONOVAN, 2019; ANWAR, *et al.*, 2021).

Os benefícios do WP em relação as suas propriedades fisiológico-funcionais, e, suas vantagens em relação a outras fontes proteicas são bem descritas na literatura. Quando comparado a caseína, o *whey protein* apresenta maior quantidade dos aminoácidos essenciais, e, portanto, maior capacidade imunomoduladora, influenciando no combate a infecções e processos inflamatórios (VASCONCELOS *et al.*, 2018; MINJ; ANAND, 2020). Além disso, alguns estudos também relataram efeitos positivos no uso para modulação intestinal e tratamento da disbiose *in vitro* e *in vivo* (SÁNCHEZ-MOYA, *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2019; SWIATECKA *et al.*, 2017). Alguns autores já constataram associação positiva do uso de

proteína em pacientes com disbiose ou com outras anormalidades intestinais na mucosa como nas doenças inflamatórias intestinais (SÁNCHEZ-MOYA *et al.*, 2017; MEDINA-VERA *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019; SWIATECKA *et al.*, 2017; VIDAL-LLETJÓS *et al.*, 2017). Estudos experimentais e *in vitro* demonstraram que o tratamento com proteínas e aminoácidos são vantajosos para a barreira intestinal, com alteração da microbiota, em que o substrato nitrogenado derivado das proteínas dietéticas estaria disponível para a atividade de bactérias no intestino melhorando o crescimento de espécies consideradas benéficas (DIETHER; WILLING, 2019; SPRONG; SCHONEWILLE; MEER, 2010).

Tendo em vista que uma grande parte das crianças com TEA apresentam disbiose e processos inflamatórios, e, que o WP devido a sua composição aminoácida derivada das proteínas do soro do leite de vaca apresenta propriedade imunomoduladora e anti-inflamatória, o propósito desse projeto é analisar experimentalmente se o uso desse suplemento é benéfico na microbiota intestinal e fatores neurocomportamentais. Para isto foi escolhido um modelo de indução de sintomas “autísticos” em animais induzido por ácido valproico (VPA) que também promove disbiose, conforme descrito por Wagner *et al.* (2006) e depois adaptado por Morakotsriwan *et al.* (2016).

O modelo de indução de autismo com o VPA, uma droga antiepiléptica, é um ótimo modelo para estudar os aspectos neurocomportamentais envolvidos com a fisiopatologia e características comuns no TEA (CHEN *et al.*, 2020; ELNAHAS *et al.*, 2020). A suplementação proteica com WP normalmente não está incluída em dietas de uso infantil, portanto, há necessidade de executar um projeto pré-clínico afim de avaliarmos a eficácia e vantagem desse tratamento. Futuramente, as crianças com TEA se beneficiariam da suplementação auxiliando na sua qualidade de vida, assim como de seus familiares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

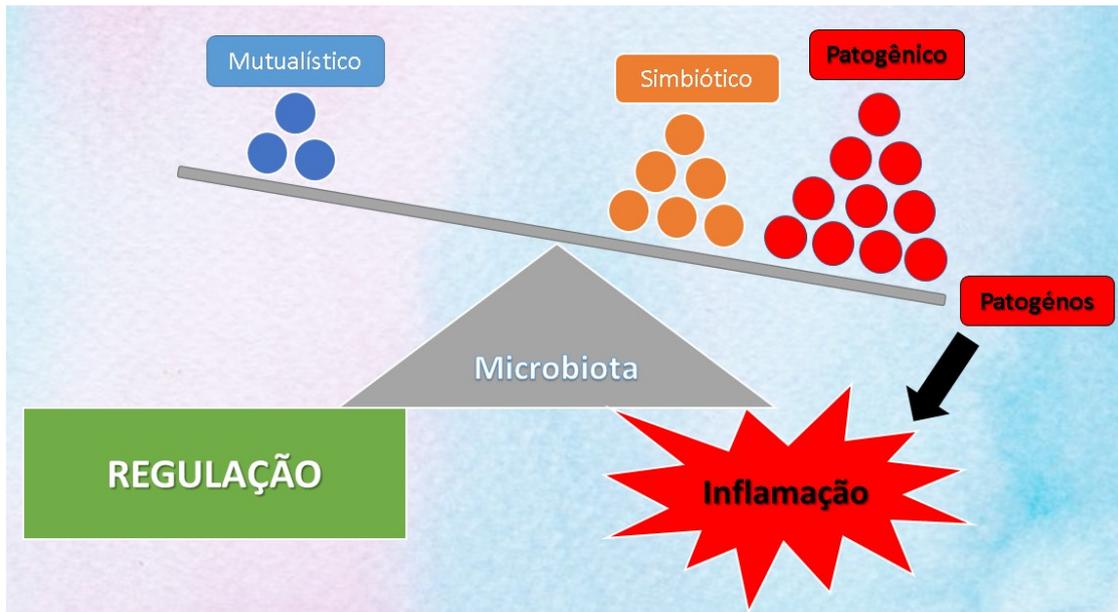
2.1 Microbiota intestinal de humanos e disbiose

O trato gastrointestinal humano é uma das maiores interfaces entre o ambiente externo e interno do organismo sendo constituído por um longo tubo de aproximadamente 9 metros que vai da boca até o ceco (ADAK; KHAN, 2019). A microbiota intestinal se refere aos microrganismos presentes no trato gastrointestinal humano (GOMAA, 2020). Estima-se que essa microbiota abrigue cerca de um trilhão de microrganismos incluindo, em sua maioria, bactérias de origem não patogênica (JOINT RESEARCH CENTER, 2018). O termo microbioma refere-se à genômica dessa microbiota, tanto o termo microbiota como microbioma caracterizam a composição de microrganismos presentes à nível intestinal (ADAK; KHAN, 2019; HILLS *et al.*, 2019).

A microbiota intestinal dos seres humanos começa a ser formada desde o útero através de interações maternas e se desenvolve até a fase adulta. A fase pré-natal é uma das mais importantes, pois nesse período o recém-nascido está se familiarizando com o ambiente extrauterino e, desse modo, colonizando sua microbiota. Com três anos de idade a microbiota já se apresenta estável sendo única àquele indivíduo (BUTEL *et al.*, 2018; MILANI *et al.*, 2017). É de grande importância a correta colonização da microbiota intestinal durante o período neonatal para desenvolvimento imunológico e metabólico do intestino adequado e saúde na vida adulta (ZHAO *et al.*, 2019; MILANI *et al.*, 2017).

A disbiose é caracterizada quando ocorre uma perturbação na composição da microbiota intestinal seja por fatores dietéticos ou ambientais como uso de terapias antibióticas, estresse psicossocial, exposição a antígenos patogênicos e alteração ou desregulação da resposta imune. Ela pode ser derivada da perda ou ganho de algumas comunidades microbiológicas específicas ou alterações na sua abundância. Contudo, os autores ainda divergem em relação a definição de quais microrganismos estão em maior e quais estão em menor quantidade para se caracterizar a disbiose (TIFFANY; BÄUMLER, 2019; WALKER, 2017). Vale a pena destacar que, a microbiota intestinal de animais é diferente da encontrada em seres humanos. Em humanos existe o predomínio de *Bacteroides* seguido de *Ruminococcaceae* e *Clostridiales* e *Actinobacteria*, já em ratos também existe *Bacteroides*, porém em segundo lugar seria o *Firmicutes* (NAGPAL *et al.*, 2018).

Figura 1 – Disbiose.



Fonte: Adaptado de Round e Mazmanian (2009).

A microbiota intestinal é muito importante para a regulação da saúde e função da barreira intestinal em seres humanos. A presença de metabólitos tóxicos e macromoléculas é diretamente dependente do tipo de fermentação que ocorre no intestino. Em resposta, essa fermentação é dependente dos tipos de bactérias e substratos disponíveis para a mesma (HILLS *et al.*, 2019; TIFFANY; BÄUMLER, 2019). Ao ocorrer a prevalência de bactérias consideradas patogênicas, têm-se a perda do estado mutualístico e essas bactérias podem gerar alteração de resposta imune com aumento de inflamação (Figura 1) (WALKER, 2017; ROUND; MAZMANIAN, 2009).

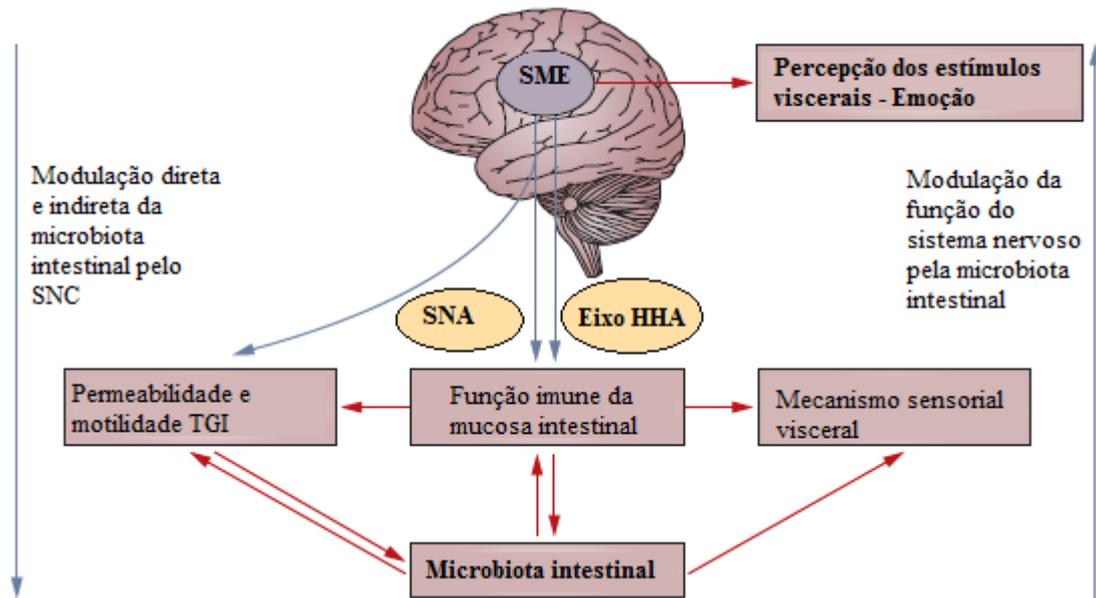
Alterações na composição da microbiota seja na diversidade de microrganismos ou sua abundância podem ser passageiras ocasionando sintomas temporários. Mas, em alguns casos a disbiose pode ter efeito mais permanente e sintomas crônicos podem ser observados (PICKARD *et al.*, 2017). Normalmente esse desequilíbrio na microbiota está associado com o aparecimento de algumas patologias como doença de Crohn e outras doenças inflamatórias intestinais, além disso, aumenta a vulnerabilidade para infecções e doenças metabólicas e neurológicas, dentre elas o TEA (LAVELLE; SOKOL, 2020; SHI; DUAN; NIU, 2017).

2.2 Eixo cérebro-intestino

O eixo cérebro-intestino refere-se a uma comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso entérico (SNE), ligando centros cognitivos e

emocionais centrais com funções intestinais periféricas, conforme observado na figura 2. O SNE apresenta cerca de 100 milhões de neurônios sendo uma parte do SNC que foi separada durante o desenvolvimento embrionário (AVILA; SOUTHARD-SMITH, 2022; CRYAN *et al.*, 2019).

Figura 2 – Eixo cérebro-intestino.



Fonte: Adaptado de Rhee, Pothoulakis e Mayer (2009). SME, sistema motor emocional; SNA, sistema nervoso autônomo; HHA, hipotálamo-hipófise-adrenal; TGI, trato gastrointestinal; SNC, sistema nervoso central.

Essa comunicação ocorre através de dois mecanismos principais: pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e/ou pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). A ligação entre SNE e SNA ocorre através das células enterocromafins presentes à nível de barreira intestinal, elas estão em contato tanto com fibras nervosas aferentes como eferentes. O nervo vago também funciona como ligação entre SNE e SNC. Essas diferentes informações que são transmitidas são capazes de modular a resposta do trato gastrointestinal e vice-versa, por exemplo, metabólitos produzidos pelas bactérias no intestino humano são capazes de estimular o SNE e influenciar no tempo de trânsito do alimento. Por outro lado, a sinalização via HHA ocorre por uma via indireta, com a liberação de hormônios que agem microbiota intestinal, como cortisol e adrenalina. O contrário também ocorre, ou seja, a microbiota sendo capaz de liberar compostos que atuam nesse eixo (RHEE; POTHOUKAKIS; MAYER, 2009).

A microbiota apresenta papel central no eixo cérebro-intestino envolvendo uma rede neural, endócrina, imune e humoral complexa, esse sistema não somente mantém a

homeostase do trato gastrointestinal como também afetam funções cognitivas centrais (AVILA; SOUTHARD-SMITH, 2022). Algumas espécies de microrganismos presentes na microbiota intestinal humana como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sintetizam o ácido γ -aminobutírico (GABA) um dos maiores neurotransmissores do SNC, além deles a *Escherichia*, *Bacillus* e *Saccharomyces spp.* produzem noradrenalina. Algumas evidências científicas sugerem que anormalidades no balanço entre neurotransmissores excitatórios (mediado pelo glutamato) e inibitórios (mediado pelo GABA) poderia ser um mecanismo fisiopatológico comum em indivíduos com o TEA (MAROTTA *et al.*, 2020; ILES, 2021). Além disso, a redução nos níveis de GABA é reportada em algumas regiões do cérebro de crianças com esse transtorno (PUTS *et al.*, 2017; AL-OTAISH *et al.*, 2018). Desse modo, uma microbiota alterada no seu pool de bactérias benéficas poderia modificar a resposta desses neurotransmissores a um nível sistêmico (BERCIK *et al.*, 2011; ROUND; MAZMANIAN, 2009).

A alimentação e o tipo de nutriente que está sendo ingerido são um dos componentes mais importantes que influenciam no eixo cérebro-intestino com efeito na composição da microbiota e sistema imune no organismo humano. A fermentação dos peptídeos e aminoácidos derivados do soro do leite de vaca pelas bactérias do intestino produz ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), ambos importantes mediadores da saúde intestinal onde atuam na relação entre o hospedeiro e as espécies de bactérias que habitam essa região (ZHAO *et al.*, 2019; NAKAMURA *et al.*, 2011). E ainda, esses metabólicos estão associados com regulação da homeostase energética e atividade anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2020; RATAJCZAK *et al.*, 2019).

2.3 Transtorno do Espectro Autista e microbiota intestinal

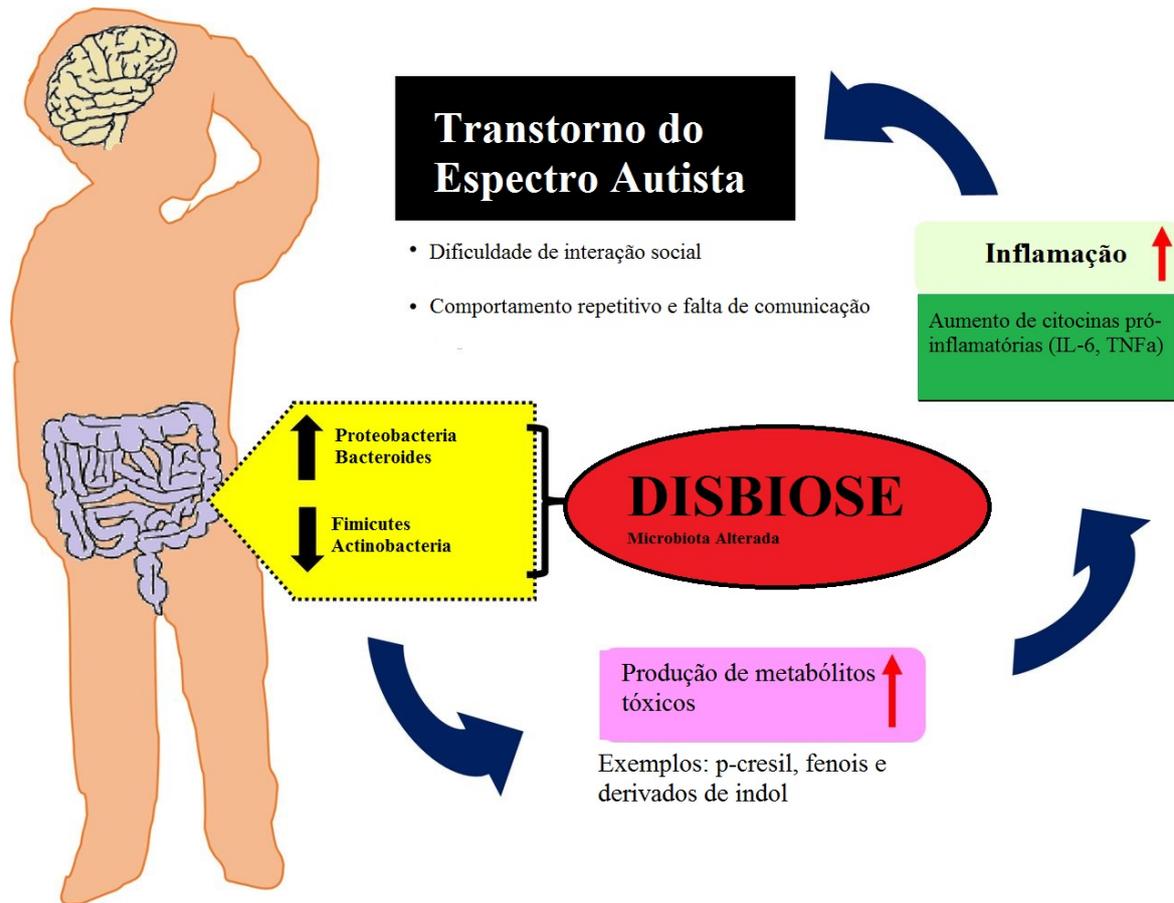
O TEA é caracterizado como uma desordem no desenvolvimento neurológico com algumas características fundamentais: dificuldade de comunicação, interação social e presença de comportamentos repetitivos ou restritivos (ILES, 2021). Conforme a Organização Pan-Americana de Saúde e a Organização Mundial de Saúde (2017), uma a cada 160 crianças nascidas apresenta o TEA. Oficialmente o Brasil não apresenta estudos epidemiológicos de prevalência, porém, em um trabalho piloto realizado na cidade de São Paulo os autores encontraram que para cada 367 crianças uma apresentava o transtorno (PAULA *et al.*, 2011). Em outro trabalho mais atual realizado no município de Armazém – Santa Catarina (SC), a prevalência encontrada foi de 21 casos na população de 8.500 habitantes (NEVES; BUSS; BECK, 2021).

Existe uma alta incidência de comorbidades do trato gastrointestinal em crianças com TEA, cerca de 40-60% dos casos. As alterações variam desde dor abdominal frequente, diarreia ou constipação (MADRA; RINGEL; MARGOLIS, 2020; ADAMS *et al.*, 2011). A disbiose e a seletividade alimentar também costumam ser prevalentes nesses indivíduos podendo ocasionar déficits nutricionais apresentando ou não comprometimento do seu estado nutricional (DEMIR; ÖZCAN, 2022). Quando comparado a crianças neurotípicas, os indivíduos com TEA apresentam uma diferença na abundância de determinadas populações bacterianas favorecendo a disbiose e alterações gastrointestinais. Alguns autores relatam que no TEA existe o aumento de bactérias do filo *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* associada a diminuição dos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Esse desbalanço pode favorecer a produção de metabolitos tóxicos a nível intestinal com conseguinte ativação de uma resposta imune gerando processos inflamatórios. A nível central essa inflamação de mucosa poderia agravar a sintomatologia, e até mesmo, influenciar no aparecimento do TEA (Figura 3) (AL-AYADHI *et al.*, 2021). Desse modo, o eixo cérebro-intestino também apresenta papel na evolução da desordem e sua manifestação sintomática gastrointestinal (YU; ZHAO, 2021; CRYAN *et al.*, 2019).

A barreira intestinal é regulada via microbiota e seus metabolitos. A disbiose no TEA está associada ao aumento da permeabilidade dessa mucosa e consequente entrada de endotoxinas e outros produtos bacterianos no sistema sanguíneo circulatório, dentre eles o lipopolissacarídeo – endotoxina da parede de bactérias gram-negativas – relacionado com sintomas característicos do transtorno (ARBERAS; RUGGIERI, 2019; ARBIZU *et al.*, 2020). Portanto, a presença de modificações na mucosa intestinal, SNE, assim como no SNC e mudanças no comportamento alimentar influenciam na gravidade dessa desordem (YU; ZHAO, 2021; MADRA; RINGEL; MARGOLIS, 2020).

A modulação intestinal em pacientes com TEA com melhora e restauração da barreira intestinal beneficiaria positivamente através da diminuição da entrada de substâncias estranhas e diminuição do estado pró-inflamatório normalizando o eixo cérebro-intestino (RISTORI *et al.*, 2019; ARBERAS; RUGGIERI, 2019).

Figura 3 – Papel da microbiota intestinal no TEA.



Fonte: Adaptado de Al-ayadhi *et al.* (2021).

2.4 Proteínas solúveis do soro do leite de vaca e modulação intestinal

A dieta e padrão alimentar apresentam grande importância na formação e composição da microbiota. O equilíbrio pode ser mantido através de um plano alimentar com alguns elementos dietéticos específicos como carboidratos complexos e proteínas (DIETHER; WILLING, 2019; HILLS *et al.*, 2019). Em relação as proteínas, a oferta de aminoácidos no cólon podem servir como substrato fermentativo para certos grupos de bactérias gerando amônia, amins biogênicas e compostos fenólicos. Tais compostos são capazes de atuar positivamente na imunomodulação e funções gastrointestinais. Além disso, a fermentação de aminoácidos contribui indiretamente para o pool de AGCC no intestino (KÅRLUND *et al.*, 2019; ANWAR *et al.*, 2021).

Um estudo realizado em ratos obesos demonstrou que o uso de WP aumentou o número de bactérias benéficas (*Bifidobacteria spp.*) restaurando a microbiota intestinal e prevenindo a disbiose nesses animais (SWIATECKA *et al.*, 2017). Em outro trabalho, nesse

caso, *in vitro*, realizado por Sánchez e colaboradores (2017), foi observado uma melhora na composição de bactérias intestinais com uso de proteínas solúveis do soro tanto do leite de vaca, assim como de outros mamíferos. Houve aumento na formação de AGCC e melhora no perfil de bactérias quando comparando amostras de indivíduos eutróficos com obesos.

A ingestão de proteínas, de acordo com a fonte proteica, pode influenciar benéficamente a saúde intestinal através de dois mecanismos: (1) modulação da quantidade e natureza dos aminoácidos fornecidos e absorvidos pelos tecidos intestinais via corrente sanguínea e, também, (2) modulação da quantidade e natureza de proteínas não digeridas entregues ao intestino. Alguns aminoácidos sozinhos ou em combinações demonstraram efeitos atenuantes na inflamação intestinal e restaurando a homeostase da mucosa, como glutamina e cisteína (BENJAMIN *et al.*, 2012; FERREIRO *et al.*, 2021). O *whey protein* funcionaria como uma fonte proteica para a mucosa intestinal, possivelmente influenciando na oferta de aminoácidos e, conseqüentemente, na melhora de algumas funções fisiológicas. Quando comparado a caseína, o WP se mostra mais benéfico devido a sua composição diferenciada em β -lactoglobulina, α -lactalbumina e lactoferrina. Essas proteínas apresentam capacidade antioxidante e anti-inflamatórias que poderia contribuir na melhora da barreira e microbiota intestinal em crianças com TEA, por exemplo (BOSCAINI *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do uso de *whey protein* na modulação intestinal e disbiose em ratos Wistar com autismo induzidos por ácido valproico.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise de parâmetros bioquímicos (bilirrubina direta, bilirrubina indireta, albumina, amilase, proteínas totais, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol total, triacilgliceróis, lipoproteína de alta densidade, lipoproteína de baixa densidade, glicemia, ácido úrico, ureia e creatinina) de alguns animais por grupo;
- Efetuar a análise hematológica (células sanguíneas das séries branca e vermelha, contagem de plaquetas, reticulócitos e índices hematológicos) de alguns animais por grupo;
- Contabilizar os microrganismos presentes nas amostras de fezes retiradas do intestino grosso de alguns animais de cada grupo;
- Analisar o peso dos animais nos diferentes grupos;
- Investigar o comportamento dos animais através dos testes de campo aberto, *Y-maze*, interação social e *marble burying*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados filhotes de ratos (*Rattus Norvegicus*) da linhagem Wistar (20-40g) com 14 dias de nascimento provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais ficaram alojados em gaiolas, com alimentos e água *ad libitum*, mantidos a um ciclo claro/escuro de 12h.

O projeto foi aceito pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA) da UFC (protocolo nº 20041119-0 – ANEXO A) e os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (2010), sendo os animais manipulados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal.

4.2 Protocolo experimental

O delineamento experimental para indução de TEA e disbiose nos animais seguiu o modelo descrito na literatura conforme proposto inicialmente por Wagner *et al.* (2006) e depois adaptado por Morakotsriwan *et al.* (2016) a partir da administração de VPA em filhotes no 14º dia pós-natal (PND14). Essa idade é considerada crítica para a migração, diferenciação, mielinização e sinaptogênese dos neurônios, correspondendo ao terceiro trimestre do desenvolvimento humano (EL-TA'ALU; ALHASSAN; FAGE, 2015).

Não foi possível encontrar na literatura modelos experimentais ou em humanos que utilizassem WP na modulação intestinal associado ao TEA e disbiose. Desse modo, em relação a concentração para a administração de WP, foi utilizado um modelo adaptado proposto por Lothian, Grey e Lands (2006) que usou o suplemento em crianças asmáticas para melhora no sistema imunológico.

4.2.1 Grupos

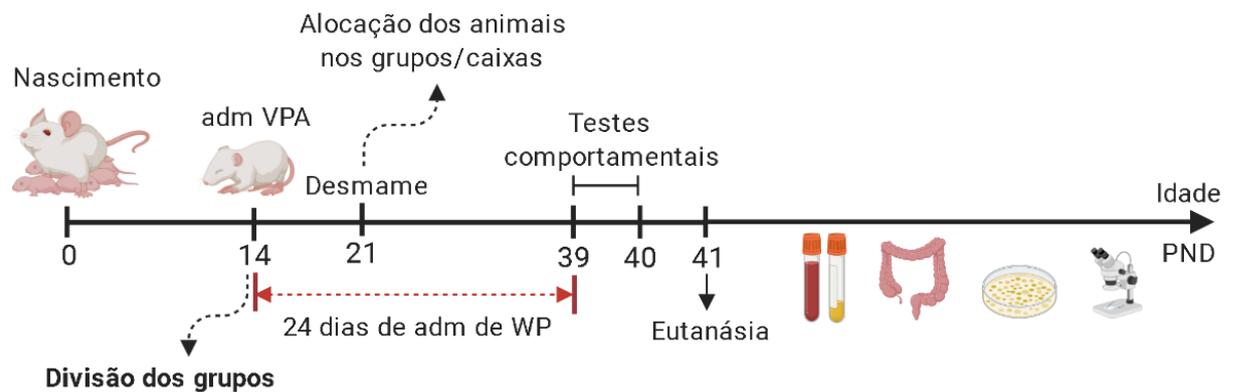
Foi solicitado ao biotério 2 fêmeas e 1 macho para reprodução, sendo colocado um macho e uma fêmea para acasalamento por vez. Quando observada a prenhez, a fêmea era separada do macho e a outra fêmea era colocada. Esse procedimento foi repetido até chegar ao número mínimo de filhotes para os grupos experimentais (7 por grupo).

Era solicitado ao biotério machos e fêmeas apenas quando o tratamento da

ninhada terminava, para que não tivesse prejuízo na logística dos testes comportamentais, eutanásia e remoção do sangue e intestino. Ao todo foi utilizado 11 fêmeas e 6 machos diferentes para acasalamento, sendo todos os filhotes usados nesse trabalho provenientes dessas ninhadas.

Após nascimento dos filhotes, no 10º dia pós-natal, foi anotado a quantidade de animais (macho e fêmea) por ninhada para posterior divisão dos subgrupos. No PND14, foi iniciado os experimentos. Os filhotes ficavam com as mães até o completo desmame (PND21), quando eram separados nas suas respectivas gaiolas.

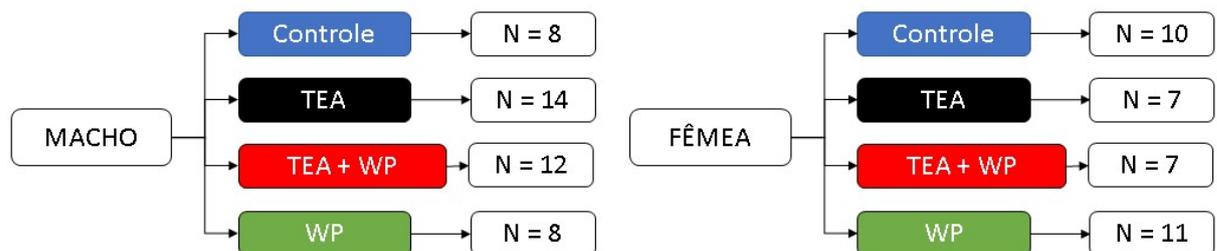
Figura 4 – Desenho experimental do projeto.



Legenda: PND, dia pós-natal; ADM, administração; VPA, ácido valproico; WP, *whey protein*. Fonte: Autor.

A divisão dos grupos foi a seguinte: Controle – administração de salina (0,1 ml/g de peso); TEA – com (TEA/disbiose – induzido por VPA); TEA + WP – com (TEA/disbiose) + suplementação de WP; WP – sem (TEA/disbiose) + suplementação de WP. Os grupos também foram divididos conforme o sexo, machos e fêmeas (Figura 5). A quantidade mínima de animais por cada grupo foi 7. No total foram utilizados 77 animais, sendo 35 fêmeas e 42 machos.

Figura 5 – Divisão dos grupos.



Legenda: TEA, transtorno do espectro autista; WP, *Whey Protein*. Fonte: Autor.

4.2.2 Concentrações de ácido valproico e whey protein

O VPA foi preparado na concentração salina de 0,9% (100 mg/mL, pH 7,3), e, depois, administrado nos filhotes dos grupos TEA e TEA + WP na dose de 400 mg/kg de peso no PND14 via subcutânea, portanto, dose única (MORAKOTSRIWAN *et al.*, 2016).

Em relação ao *whey protein*, foi utilizado WP tipo hidrolisado e isolado sabor chocolate da marca *Optimum Nutrition*®. Esse WP apresenta as proteínas na forma parcialmente hidrolisada, e, ainda é acrescido dos aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) (isolado). A sua utilização se justifica pelo fato de prover as proteínas em uma forma estrutural possivelmente mais adequada para a fermentação bacteriana, além de fornecer os aminoácidos considerados benéficos para imunomodulação e síntese proteica (FERREIRO *et al.*, 2021). A administração foi feita na fase que corresponde a infância do animal, do 14º ao 38º dia pós-natal (EL-TA'ALU; ALHASSAN; FAGE, 2015), sendo 24 dias de tratamento.

As doses do WP foram calculadas com base no cálculo da Dose Animal Equivalente (DAE) baseada na superfície corporal proposto pela *Food and Drug Administration* (2002): Dose humana: 200 mg/kg (LOTHIAN; GREY; LANDS, 2006). Dose no rato: $200 \times 6,2$ (constante) = 1240 mg/kg ou 1,24 mg/g. Portanto, 1,24 mg de WP para cada grama de peso do animal.

Os animais foram pesados diariamente a partir da data de início do tratamento, sendo todos os valores anotados. Além disso, os grupos foram tratados sempre no mesmo horário (manhã). O tratamento consistiu em administrar via gavagem (oral) o WP, objeto da pesquisa, durante sete dias por semana por um período de 24 dias. Já para o grupo controle e TEA foi administrado 1 mL de água potável pela mesma via.

4.2.3 Protocolo das vias de administração

O método utilizado para a contenção dos animais foi pela cauda por meio de uma manobra rápida e cuidadosa, em que o animal é prontamente colocado em uma superfície de apoio, para que seja evitado o desconforto. A imobilização foi realizada pela base da cauda para prevenir que ocorram fraturas, divisão da pele e consequentes ferimentos. A cabeça foi segura com o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula.

O VPA foi administrado via subcutânea nos filhotes através de uma agulha de 13x25 no volume conforme protocolo proposto descrito acima. A administração subcutânea é fácil e raramente dolorosa. A administração foi realizada na pele solta das áreas dorsolaterais do pescoço. Nesse procedimento, o animal foi contido manualmente e, então, apoiado sobre

uma superfície limpa, a agulha foi inserida sob a pele solta, apreendida com o polegar e o indicador, e, em seguida, injetado via substância (DIEHL *et al.*, 2001).

Durante a gavagem os preparados de WP foram introduzidos na cavidade oral ou no aparelho digestório através de um tubo estomacal (agulha de gavagem animal). Para isso foi utilizado uma agulha, aproximadamente 8 cm de comprimento, curvado com a ponta arredondada e sendo introduzido na boca do animal e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago. Todo procedimento foi feito cautelosamente para assegurar que o tubo não tenha penetrado inadvertidamente a traqueia. O volume foi de 1 mL de solução para cada 100g de peso corporal. Na presença de resistência ou suspiros dos animais ou ainda se tornarem-se azul, a administração foi parada imediatamente e agulha removida.

Ao término do tratamento de 24 dias, ou seja, após a última administração do WP nos animais, foi realizado os testes comportamentais, coleta do sangue, intestino e eutanásia.

4.2.4 Eutanásia e coleta do intestino grosso

Após o término do tratamento, os animais foram anestesiados com uma única injeção intraperitoneal de coquetel de quetamina e xilazina na proporção de 9 mg/mL:0,9 mg/mL. Imediatamente após a anestesia, foi retirado sangue dos animais via punção cardíaca. A quantidade de sangue extraída foi a máxima possível, entre 3 a 5 mL, sendo dividida em 2 tubos (um para o hemograma e um para análise bioquímica). Depois foi retirado o intestino grosso o qual foi colocado em tubo de vidro estéril e depois acondicionado em temperaturas abaixo de 4°C para posterior retirada das fezes e análise das bactérias. Por último, foi retirado o coração dos animais para confirmar a eutanásia por exsanguinação.

4.2.5 Análise das bactérias

As amostras fecais foram mantidas imediatamente após a coleta a 4 °C e armazenadas até a análise. As contagens de bactérias cecais foram determinadas por microbiologia, crescimento em placa e contagem de colônias conforme descrito por Junior *et al.* (2016).

Cada amostra intestinal coletada dos animais sacrificados foi semeada para cultivo bacteriológico. Foi utilizado uma pinça estéril para depositar o material numa placa de *petri* estéril e vazia à qual foi adicionado 1 mL de soro fisiológico estéril. Com o auxílio de um bisturi o fragmento foi triturado misturando-se bem os pequenos fragmentos triturados ao soro fisiológico, até que este tenha apresentado a aparência de turvação. Com o auxílio de uma

com pipeta calibrada, usando ponteira estéril, inoculou-se, 0,01 mL do soro com alguns fragmentos para um ponto superior das placas de ágar-sangue (ASA) e placa cromogênica CPS (BioMerieux). O material foi estriado em toda a extensão da placa com a alça bacteriológica fazendo estrias horizontais e verticais. Transferiu-se o restante do material para um tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo *Brain-Heart-Infusion* (BHI). As placas e o tubo de BHI foram incubados em estufa a 35 °C (+/- 1) por 24 horas. Após o tempo de incubação as placas foram inspecionadas para a observação qualitativa e quantitativa das unidades formadoras de colônias (U.F.C.).

Das placas de ASA e CPS foram selecionadas as colônias com características morfológicas distintas e em seguida as foram re-isoladas. As colônias puras, provenientes de todos os meios seletivos ensaiados, foram submetidas à coloração pelo método de Gram e identificadas pelo MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*).

4.2.6 Doseamento bioquímico

Para avaliar os efeitos dos preparados sobre o organismo animal, foi utilizado o Analisador Bioquímico Automático *Labmax plenno*, modelo standard (Labtest, Brasil). Os exames foram realizados seguindo os protocolos do fabricante do equipamento e dos kits reagentes para cada parâmetro a ser avaliado. Os resultados das provas bioquímicas sanguíneas foram fornecidos mediante a impressão automatizada, após a realização da leitura pelo analisador bioquímico. Os parâmetros bioquímicos analisados foram: bilirrubina direta, bilirrubina indireta, albumina, amilase, proteínas totais, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase, (ALT) colesterol total, triacilgliceróis, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade, glicemia, ácido úrico, ureia e creatinina.

4.2.7 Hemograma completo

Hemograma é um exame que avalia as células sanguíneas, ou seja, as da série branca e vermelha, contagem de plaquetas, reticulócitos e índices hematológicos. A coleta da amostra foi feita através de punção cardíaca, e, o sangue foi imediatamente encaminhado para o Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT/UFC). Para realização do hemograma foi utilizado o aparelho Mindray, BC-5150. O resultado foi fornecido imediatamente com a contagem de células vermelhas (eritograma), da linha branca

(leucograma) e plaquetas.

4.3 Testes Comportamentais

4.3.1 *Teste do Campo Aberto*

Foi utilizada uma caixa quadrada feita de acrílico (paredes pretas e piso preto, 120 x 120 cm) em seguida o animal foi colocado no centro desse ambiente e seu comportamento foi anotado por 5 min (após 1 minuto de habituação) para posterior análise. Para registro, o piso da caixa é dividido em 9 quadrados de 20 cm, onde em cada quadrado foi registrado a frequência e a duração dos seguintes comportamentos conforme a metodologia de File e Hyde (1978): número de vezes que cruzou com as quatro patas os quadrados do campo aberto, frequência limpando-se (*grooming*), levantando-se (*rearing*). O teste tem por finalidade avaliar a atividade exploratória do animal.

Figura 6 – Teste campo aberto.



Fonte: Figura adaptada do aparato da *Creative Biolabs*. Disponível em: <<https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/open-field-test.htm>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2022.

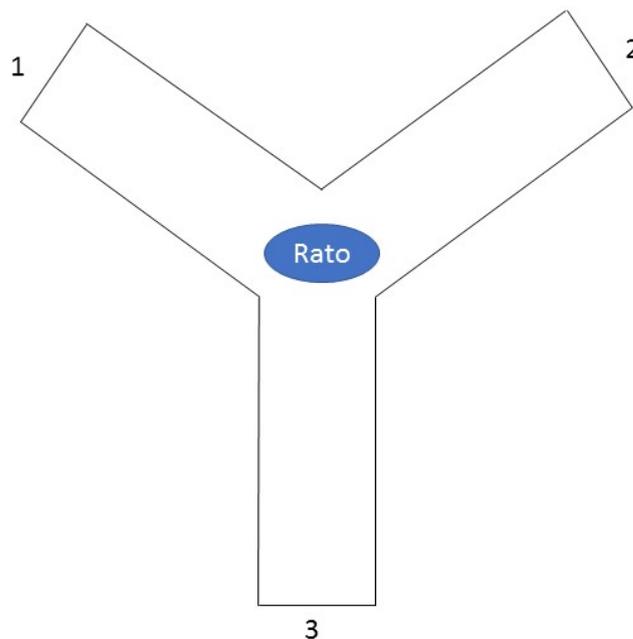
4.3.2 *Teste Y-maze*

Foi utilizado um labirinto em forma de Y com três “braços” (10 x 50 cm) opacos em um ângulo de 120° de separação entre eles. O animal foi colocado no centro do aparato sendo o deixado no ambiente por 8 minutos (1 minuto de habituação). O teste mensura a vontade dos animais em explorar novos ambientes, além de avaliar a memória operacional ou

de trabalho.

Foi analisado se o animal após entrar muitas vezes em um determinado “braço” deixará de entra-lo. O número de entradas em cada “braço” também foi registrado e depois foi calculada a porcentagem de alternância entre os “braços” feita pelo animal. Foi considerada uma entrada quando todos os quatro membros do animal penetraram em um “braço” do labirinto (SARTER *et al.*, 1988).

Figura 7 – Teste *Y-maze*.

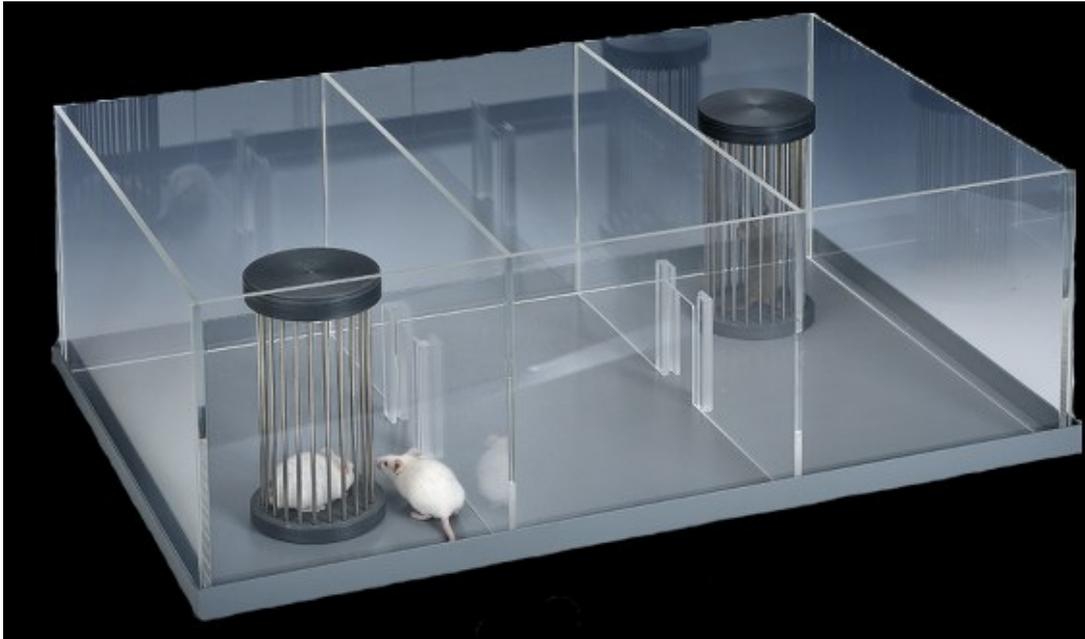


Fonte: Autor.

4.3.3 Teste de interação social

Nesse teste foi utilizado o aparato para camundongos, pois o biotério não dispunha do aparato para ratos. Como os animais eram filhotes o teste pode ser feito. O equipamento do teste consiste em um caixa dividida em três câmaras sendo a central neutra e com aberturas para as duas laterais, onde nos compartimentos laterais existem duas gaiolas de ferro, uma vazia e a outra não. Nesta, foi colocado outro animal desconhecido, do mesmo sexo e tamanho do animal que foi avaliado. Os ratos ficaram 5 minutos de exploração. Nesse teste foi avaliado o tempo que o animal permaneceu explorando o compartimento com o animal estranho a ele e sem o animal (RADYUSHKIN *et al.*, 2009).

Figura 8 – Teste interação social.



Fonte: Aparato da UgoBasile. Disponível em: <<https://www.ugobasile.com/products/catalogue/behaviour-mazes-tracking/item/30-46503-sociability-apparatus-3-chambered-social-test>>. Acesso em: 25 de fevereiro de 2022.

4.3.4 Teste *Marble burying*

Para a realização do teste, utilizou-se uma caixa de material transparente, com 5 cm de maravalha como ‘cama’. Após a disposição da maravalha na superfície, foram colocadas aproximadamente vinte pequenas esferas de vidro com cerca de um 1 cm no diâmetro (coloquialmente conhecidas como “bolinhas de gude”) na caixa, sendo formadas cinco fileiras com quatro esferas cada e com intervalos de aproximadamente 1,5 cm. Os animais foram colocados cuidadosamente na caixa com as bolinhas de gude e ficaram explorando por 30 minutos.

Quando se iniciou o teste, logo após os animais serem colocados dentro da caixa, todos saíram da sala e só retornam após 30 minutos para retirar o animal e iniciar a contagem de bolas escondidas. Os animais foram então retirados com cuidado para evitar a movimentação das bolas de gude ou da maravilha. As bolas foram consideradas escondidas se estiverem 2/3 enterradas na maravalha. Esse teste facilita a investigação do comportamento compulsivo, neofobia e ansiedade em roedores (TREIT; PINEL; FIBIGER, 1981).



Figura 9 – Teste *marble burying*.

Fonte:

Autor.

4.4 Análises dos dados

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk devido a quantidade diferente de animais por grupo. Normalidade e homogeneidade foi considerada quando $p > 0,05$. Quando apropriado, foi realizado a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de significância Tukey. Quando a distribuição não seguiu padrão normal, foi feito o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunn's. O programa utilizado foi o GraphPad Prism 8. Os resultados estão expressos como média \pm *standard error of the mean* (SEM). A estatística foi considerada significativa quando o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Em relação as análises bioquímicas e hematológicas os grupos machos e fêmeas foram analisados em conjunto devido ao número limitado de amostras. Muitas amostras de hemograma coagularam devido a técnica de punção cardíaca, além disso, a quantidade retirada, por vezes, não conseguia ser o suficiente para o hemograma e bioquímico sendo um viés para realização da análise estatística separada de machos e fêmeas. Cabe ainda ressaltar que a retirada do sangue foi feita apenas em uma parte dos animais por questões logísticas e de recursos materiais. Em contrapartida, as análises de peso e comportamentais foram feitas com a quantidade total de animais de cada grupo conforme descrita na metodologia (Figura 5), separando machos e fêmeas.

5.1 Resultado ponderal

As Figuras 10 e 11 (A) mostram que não houve diferença de peso entre os grupos antes do início dos experimentos. As Figuras 10 e 11 (B) mostram que os grupos tiveram um ganho de peso gradual em relação ao tempo de tratamento. As Figuras 10 e 11 (C) mostram que os grupos TEA e TEA + WP diminuíram de peso quando comparado aos grupos controle e WP ($p < 0,05$). Os resultados foram similares entre machos e fêmeas.

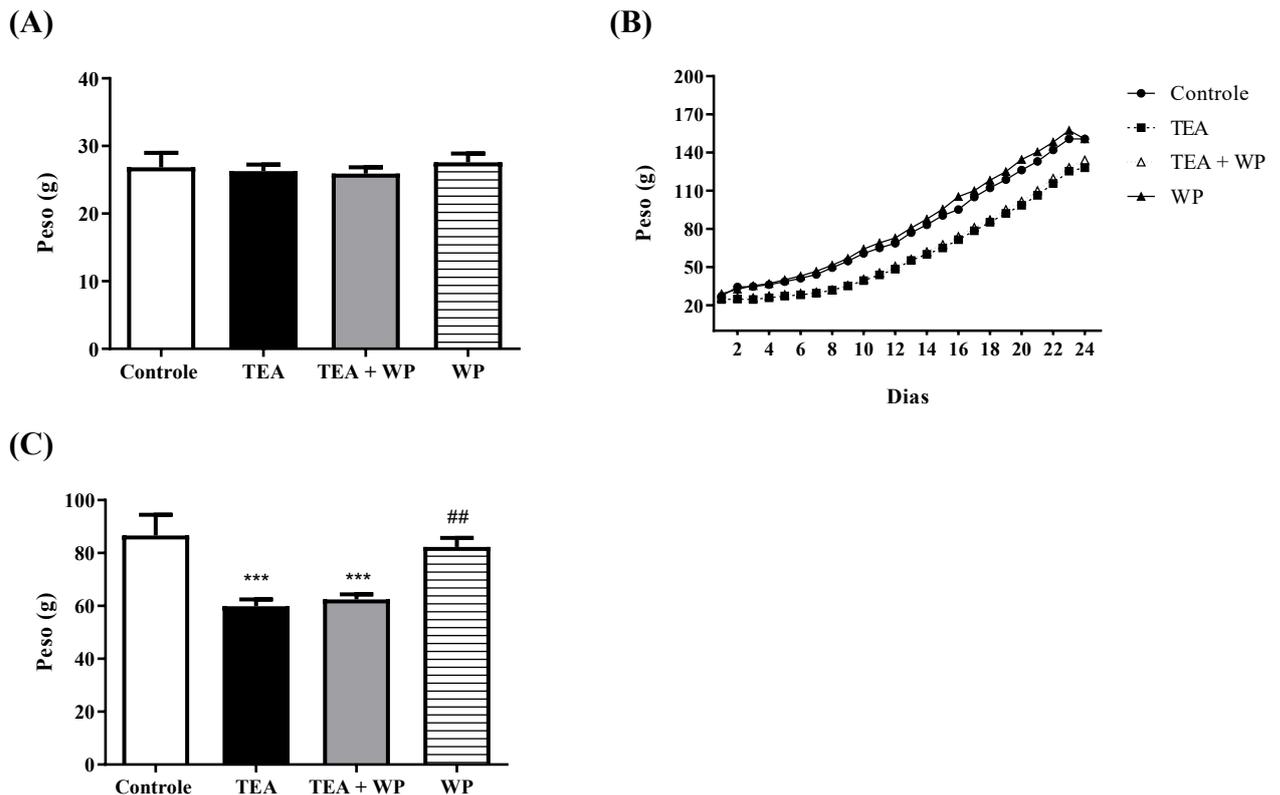


Figura 10 – (A) Peso corporal antes do tratamento, sem diferença significativa. (B) Evolução de peso dos grupos de animais. (C) Comparação do ganho de peso entre os grupos. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle ($***p < 0,001$). Diferenças estatísticas em relação aos grupos TEA e TEA + WP ($##p < 0,01$). Valores expressos em média (n = 8-14). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

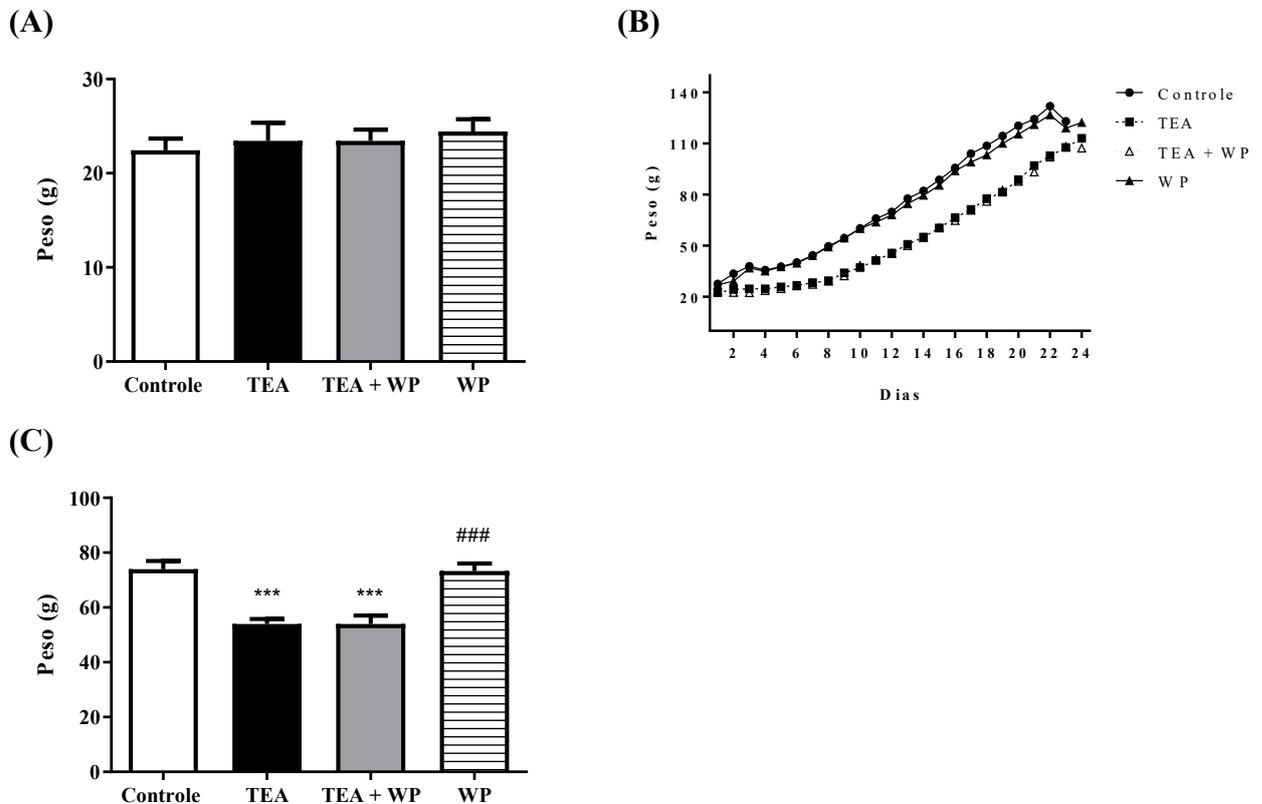


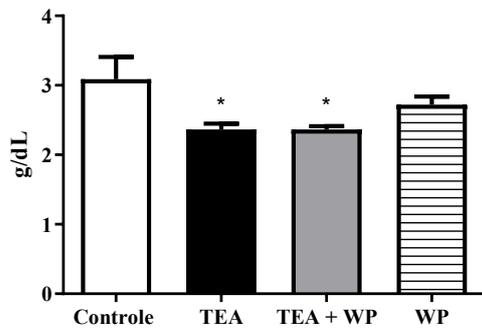
Figura 11 – (A) Peso corporal antes do tratamento, sem diferença significativa. (B) Evolução de peso dos grupos. (C) Comparação do ganho de peso entre os grupos. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle ($***p < 0,001$). Diferenças estatísticas em relação aos grupos TEA e TEA + WP ($###p < 0,001$). Valores expressos em média (n = 7-11). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Portanto, a suplementação de *whey protein* não foi capaz de aumentar o peso dos animais (sem diferença significativa entre TEA e TEA + WP), e, o tratamento com *whey protein* sem estar associado ao TEA, também não foi capaz de aumentar o peso quando comparado ao controle.

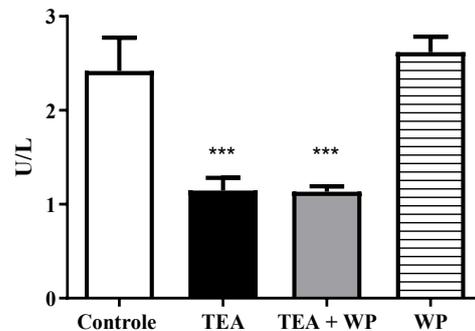
5.2 Resultados bioquímicos

Os resultados bioquímicos demonstraram que nos animais com TEA as proteínas totais, albumina e globulina foram menores em comparação ao grupo controle ($p < 0.05$), contudo, nenhuma associação foi encontrada quando comparou-se o grupo TEA com o grupo TEA + WP (Figura 12).

(A) Albumina



(B) Globulina



(C) Proteínas totais

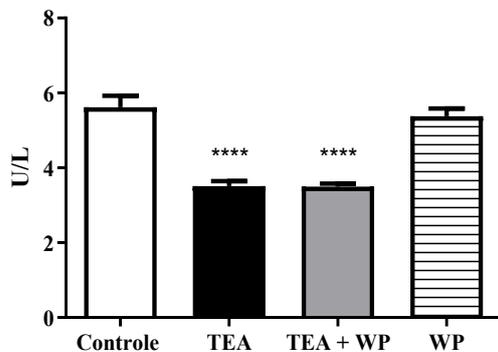


Figura 12 – Proteínas séricas. (A) Albumina (g/dl), (B) Globulina (U/L), (C) Proteínas totais (U/L) de animais tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Valores expressos como média \pm SEM ($n = 9-13$). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Bilirrubina direta (Figura 13), HDL-c (Figura 14) e ácido úrico (Figura 15) também foram significativamente menores nos grupos com TEA (TEA e TEA + WP) em relação ao controle e WP ($p < 0,05$). Quanto a bilirrubina indireta, amilase, fosfatase alcalina, AST, ALT, colesterol total, triacilgliceróis, lipoproteína de baixa densidade, glicemia, ureia e creatinina, nenhuma relação significativa foi encontrada entre os grupos ($p > 0,05$).

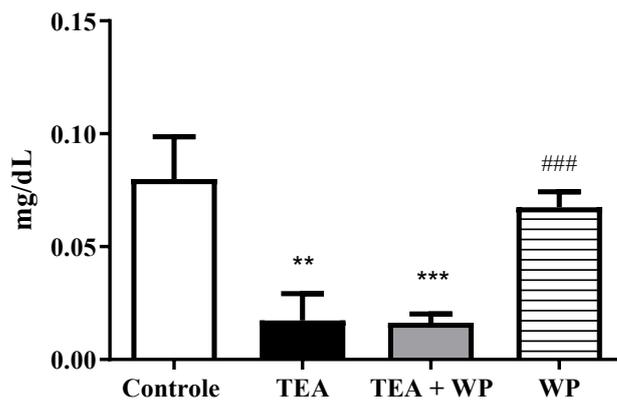


Figura 13 – Bilirrubina direta (mg/dl) de animais tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. Teste Krustal-Wallis seguido do post-hoc de Dunn's. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle (**p < 0,01; ***p < 0,001). Diferenças estatísticas em relação ao TEA e TEA + WP (###p < 0,001). Valores expressos como média ± SEM (n = 9-13). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

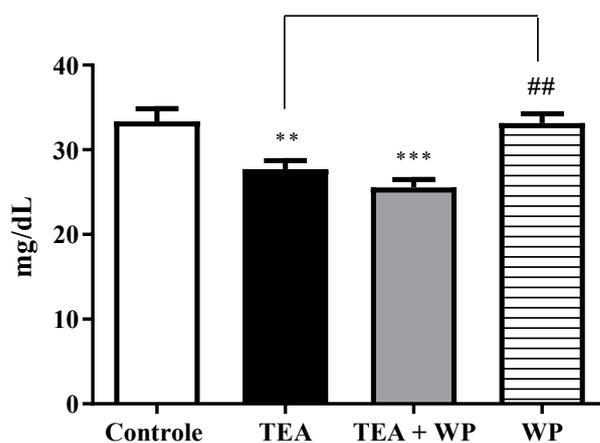


Figura 14 – HDL-colesterol (mg/dl) de animais tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle (**p < 0,01, ***p < 0,001). Diferenças estatísticas em relação ao TEA (##p < 0,01). Valores expressos como média ± SEM (n = 10-13). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

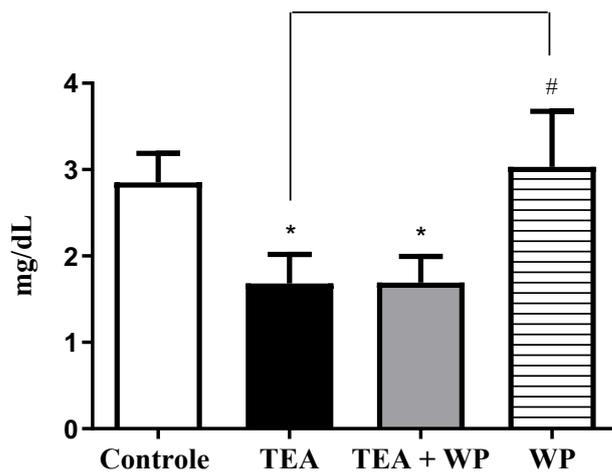


Figura 15 – Ácido úrico (mg/dl) de animais tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. Teste Krustal-Wallis seguido do post-hoc de Dunn's. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle (* $p < 0,05$). Diferenças estatísticas em relação ao TEA (# $p < 0,05$). Valores expressos como média \pm SEM ($n = 9-12$). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Desse modo, as análises bioquímicas demonstraram que o VPA é capaz de alterar a concentração de proteínas séricas dos animais, diminuindo seus valores ($p < 0,05$), contudo, a suplementação de *whey protein* (1,24 mg/kg – 24 dias) não foi capaz de reverter tais mudanças, já que não teve associação significativa entre os grupos TEA e TEA + WP ($p > 0,05$). Além disso, os grupos Controle e WP se comportaram da mesma forma, ou seja, sem diferença ($p > 0,05$), indicando que WP sozinho também não influenciou a análise bioquímica nesses animais.

5.3 Resultados hematológicos

Em relação aos parâmetros hematológicos, eritrócitos, hemoglobina e hematócrito estavam menores nos grupos administrados com VPA comparado ao controle ($p < 0,05$), porém nenhuma associação foi encontrada entre os grupos TEA e TEA + WP (Figura 16)

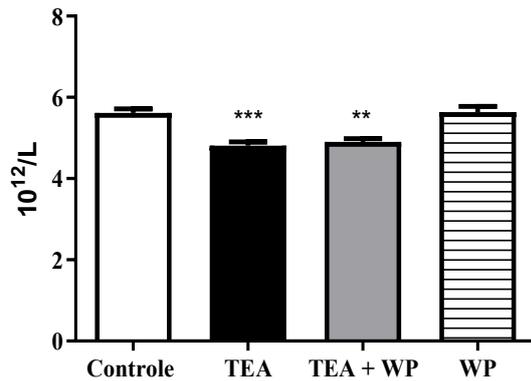
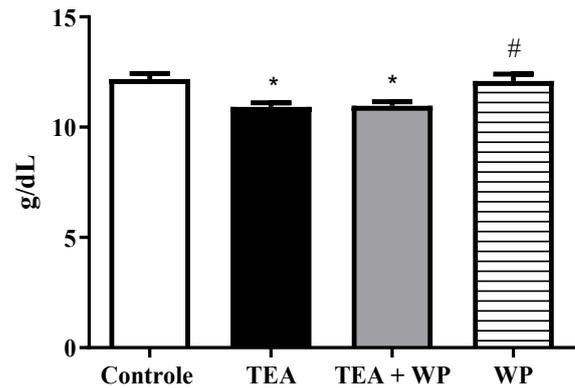
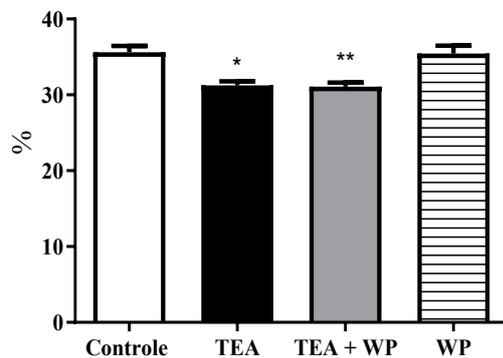
(A) Eritrócitos**(B) Hemoglobina****(C) Hematócrito**

Figura 16 – Eritrograma (série vermelha). (A) Eritrócitos (10¹²/L), (B) Hemoglobina (g/dL), (C) Hematócrito (%) de animais tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001). Diferenças estatísticas em relação ao TEA e TEA + WP (#p < 0,05). Valores expressos como média ± SEM (n = 5-10). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Alguns outros parâmetros também foram significativos: % de linfócitos do grupo TEA + WP estava menor em relação ao grupo controle (p < 0,05), a concentração de hemoglobina corpuscular média foi significativamente maior nos grupos administrados com VPA (TEA e TEA + WP) comparado ao controle e WP (p < 0,05), e, a amplitude de variação de eritrócitos estava maior no grupo WP comparado aos grupos TEA e TEA + WP (p < 0,05).

Em resumo, as análises hematológicas revelaram que o VPA é capaz de induzir alterações significativas importantes no eritrograma, entretanto, a suplementação de *whey*

protein não reverteu tais alterações. Além disso, a administração de *whey protein* sozinho não alterou nenhum parâmetro hematológico (sem diferença significativa entre controle e WP).

5.4 Resultados comportamentais

5.4.1 Campo aberto

Tanto nos machos como nas fêmeas nenhuma medida avaliada no campo aberto foi significativa quando comparado entre os grupos ($p > 0,05$). Contudo, apenas nos machos, o número de elevações nas quatro patas (*rearing*) teve uma tendência a diminuir nos grupos TEA e TEA + WP em relação ao controle. Além disso, os animais do grupo TEA tiveram uma diminuição no número cruzamentos (*crossing*) quando comparado ao controle, e, o grupo tratado com WP que apresentava TEA teve uma tendência a aumentar esse valor.

Tabela 1. Resultado campo aberto

Parâmetros avaliados	Grupos	Média ± SD		Valor de p ^a	
		Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Número de cruzamentos	Controle	90,25 ± 27,75	83,10 ± 16,06		
	TEA	63,77 ± 18,03	83,29 ± 18,05	3,134	0,03102
	TEA + WP	82,33 ± 22,38	86,29 ± 12,88	0,9224 e 2,466 ^b	0,5321 e 0,4620 ^b
	WP	91,50 ± 40,28	90,27 ± 19,688	0,1329	1,351
Número de elevações	Controle	19 ± 12,96	13,10 ± 7,78		
	TEA	12,14 ± 6,024	9 ± 3,91	2,758	1,732
	TEA + WP	9,417 ± 3,75	10,43 ± 4,39	3,743 e 1,235 ^b	1,128 e 0,5563 ^b
	WP	14,88 ± 9,17	10,36 ± 8,24	1,471	1,304
Número de autolimpeza	Controle	1,250 ± 1,28	0,8 ± 0,788		
	TEA	1 ± 0,679	0,5714 ± 0,79	0,7739	0,7954
	TEA + WP	1 ± 1,13	1,143 ± 0,89	0,7515 e 0,0 ^b	1,193 e 1,833 ^b
	WP	1,125 ± 1,13	0,9091 ± 0,83	0,3430	0,4282

Legenda: Macho, n = 8-14. Fêmea, n = 7-11. ANOVA, Tukey como post hoc test. ^aValor de p em relação ao controle; ^bValor de p em relação ao TEA. Nenhum grupo foi significativo comparado ao controle e entre si ($p > 0,05$). SD, *standard deviation*; TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

5.4.2 Y-maze

Quanto ao teste do labirinto em Y, no grupo das fêmeas, apenas o parâmetro ‘retorno para mesmo braço’ teve diferença significativa. Ele avalia quantas vezes o animal retornou para o braço que ele havia saído recentemente, indicando comprometimento de memória e comportamento repetitivo (Figura 17).

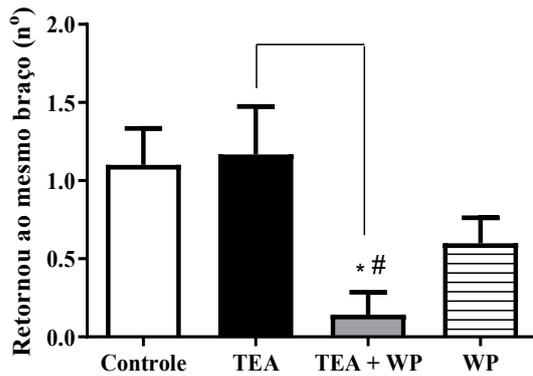


Figura 17 – Número de vezes que retornou ao braço. Animais fêmeas tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças estatísticas entre o grupo e o controle (* $p < 0,05$). Diferenças estatísticas em relação ao TEA (# $p < 0,05$). Valores expressos como média \pm SEM ($n = 7-11$). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Nos machos, o número de alternância entre os braços foi significativamente maior no grupo TEA + WP comparado aos grupos controle e TEA ($p < 0,05$) (Figura 18). O mesmo foi encontrado para o parâmetro % de alternância entre os braços. Além disso, o grupo WP também teve diferença significativa quando comparado ao controle (Figura 19). Desse modo, a suplementação com *whey protein* foi capaz de aumentar a capacidade de alternância desses animais. Os outros critérios avaliados não tiveram diferenças significativas entre os grupos.

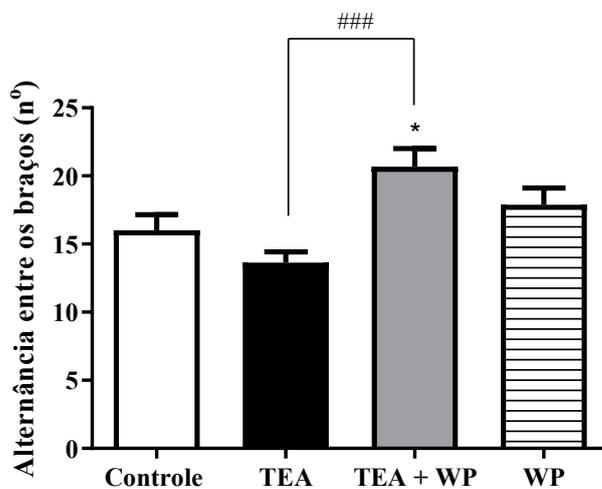


Figura 18 – Número de alternância entre os braços. Animais machos tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle (* $p < 0,05$,

**** $p < 0,0001$). Diferença estatística em relação ao TEA (### $p < 0,001$). Valores expressos como média \pm SEM ($n = 8-14$). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

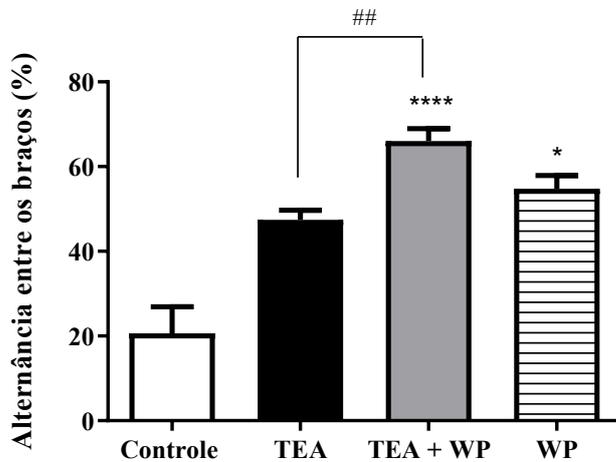


Figura 19 – Alternância entre os braços (%). Animais machos tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. Teste Krustal-Wallis seguido do post-hoc de Dunn's. Diferenças estatísticas entre os grupos e o controle (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$). Diferença estatística em relação ao TEA (## $p < 0,01$). Valores expressos como média \pm SEM ($n = 8-14$). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Percebe-se que o *whey protein* melhorou positivamente a memória desses animais, os grupos suplementados com *whey protein* tiveram alternância maior e retorno ao braço menor comparado com o grupo TEA e controle, macho e fêmea, respectivamente. Também houve diferença significativa entre os grupos TEA e TEA + WP, no qual o uso de WP aumentou a alternância entre os braços do labirinto (machos). Entretanto, ao se analisar isoladamente os grupos controle e TEA, o ácido valproico não alterou os parâmetros relacionados a memória, pois não houve diferença relevante entre esses grupos.

5.4.3 Interação social

O teste de interação social avalia a sociabilidade do animal. Espera-se que os animais que sofreram a indução do TEA com ácido valproico tenham medo e receio em entrar na câmara com animal estranho e fiquem mais tempo na câmara sem animal. Tal comportamento foi observado nos animais desse estudo. Tanto macho como fêmea, do grupo TEA, ficaram mais tempo na câmara em que não tinha animal e menos tempo na câmara com animal ($p < 0,05$) (Figura 20).

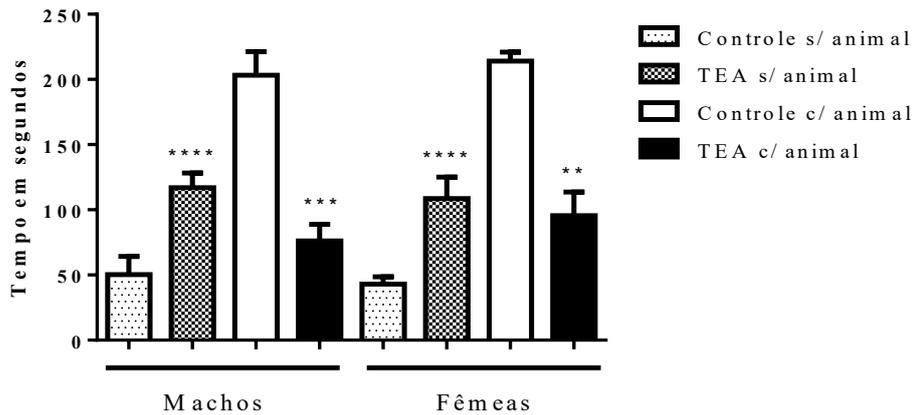


Figura 20 – Tempo gasto, em segundos, do animal teste na câmara com e sem o animal estranho. Animais machos e fêmeas tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças significativa entre os grupos e o controle (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Valores expressos como média \pm SEM (8-14). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Em relação ao grupo TEA e TEA + WP também houve diferença significativa apenas na medida de ‘tempo na câmara sozinho’ e ‘% de tempo na câmara sozinho’ ($p < 0,05$). Isso indica que a suplementação de *whey protein* foi capaz de diminuir o tempo que os animais passaram na câmara sozinho (Figura 21).

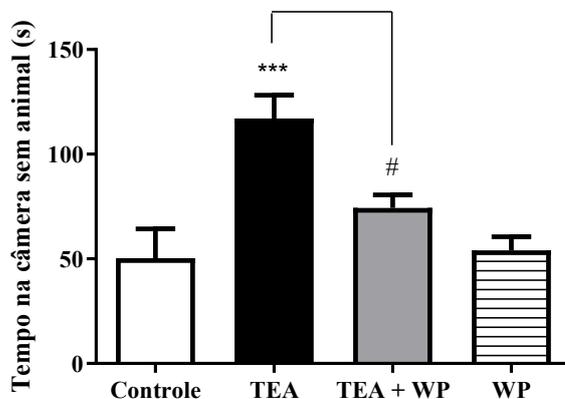


Figura 21 – Tempo gasto, em segundos, do animal teste na câmara sem o animal estranho. Animais machos tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças

significativa entre os grupos e o controle (**p < 0,001). Diferenças significativa em relação ao TEA (#p < 0,05). Valores expressos como média ± SEM (8-14). TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*, S, segundos.

5.4.4 Marble burying

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos (p > 0,05), indicando que no modelo utilizado nesse projeto, os animais com TEA e aqueles suplementados com *whey protein* não apresentam comportamentos estereotipados ou padrões compulsivos.

Tabela 2. Resultados *marble burying*

Parâmetros avaliados	Grupos	Média ± SD		Valor de p ^a	
		Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Bolinhas enterradas	Controle	17,29 ± 2,058	18,4 ± 2,36		
	TEA	16,79 ± 3,11	17,57 ± 2,22	0,5752	1,027
	TEA + WP	18,17 ± 1,85	19 ± 1,53	0,9864 e 1,869 ^b	0,7434 e 1,632 ^b
	WP	17,25 ± 3,19	17,73 ± 2,69	0,03675	0,9401
Bolinhas não enterradas	Controle	2,71 ± 2,05	1,6 ± 2,36		
	TEA	3,21 ± 3,11	2,43 ± 2,22	0,5752	1,028
	TEA + WP	1,83 ± 1,85	1 ± 1,53	0,9864 e 1,869 ^b	0,7441 e 1,634 ^b
	WP	2,75 ± 3,19	2,5 ± 2,72	0,03675	1,23

Legenda: Macho, n = 8-14. Fêmea, n = 7-11. ANOVA, Tukey como post hoc test. ^aValor de p em relação ao controle; ^bValor de p em relação ao TEA. Nenhum grupo foi significativo comparado ao controle e entre si (p > 0,05). SD, *standard deviation*; TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

5.5 Resultados microbiológicos

Em relação a diversidade de grupos taxonômicos encontrados apenas dois filos se destacaram, Proteobacteria e Firmicutes, dentro deles foram achados 12 gêneros distintos: *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella* e *Lactobacillus spp* (Tabela 3). Todas as espécies encontradas fazem parte da microbiota normal do intestino de mamíferos (BUTEL *et al.*, 2018).

Tabela 3. Diversidade e quantidade (U.F.C./g) da microbiota encontrada nos diferentes grupos.

Espécies / U.F.C./g	Filo	Macho				Fêmea			
		Controle	TEA	TEA + WP	WP	Controle	TEA	TEA + WP	WP
<i>Escherichia coli</i>	Proteobacteria	-	7 x 10 ⁴	5,7 x 10 ⁵	-	1,7 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵	4 x 10 ⁵	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	Firmicutes	9 x 10 ³	3,5 x 10 ⁴	4,05 x 10 ⁵	4 x 10 ⁴	2,75 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵	3,2 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵
<i>Enterococcus faecium</i>	Firmicutes	-	-	-	-	5 x 10 ³	-	-	-
<i>Enterococcus avium</i>	Firmicutes	3 x 10 ³	-	-	2 x 10 ⁴	5,5 x 10 ³	-	1 x 10 ⁴	-
<i>Enterococcus galinarum</i>	Firmicutes	3 x 10 ³	-	-	1 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁴	-	-	5,58 x 10 ⁵
<i>Enterobacter cloacae</i>	Proteobacteria	-	-	-	-	-	-	-	5 x 10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	Firmicutes	1 x 10 ³	-	-	6 x 10 ⁵	-	-	-	4 x 10 ⁴
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Firmicutes	-	-	5 x 10 ³	5 x 10 ³	-	-	-	1 x 10 ⁵
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Firmicutes	-	-	-	5 x 10 ³	5 x 10 ²	-	-	7 x 10 ³
<i>Staphylococcus warneri</i>	Firmicutes	-	-	-	-	-	-	-	1 x 10 ⁵
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Proteobacteria	-	-	2 x 10 ⁴	-	-	-	1 x 10 ⁴	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Proteobacteria	-	-	-	-	-	1 x 10 ⁴	-	-
<i>Lactobacillus spp.</i>	Firmicutes	-	-	2 x 10 ⁵	3,15 x 10 ⁵	-	-	-	1,6 x 10 ⁴
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	Firmicutes	-	-	-	5 x 10 ³	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	Proteobacteria	-	-	5 x 10 ⁴	-	-	-	1 x 10 ⁵	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Proteobacteria	-	-	2 x 10 ⁴	-	-	-	1 x 10 ⁴	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteobacteria	-	3 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	-	-	2 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵	-
<i>Proteus mirabilis</i>	Proteobacteria	-	3 x 10 ⁴	-	-	-	1 x 10 ⁴	-	-
BGN anaeróbico	Sem definição	-	-	-	1 x 10 ³	-	-	-	-
BGP anaeróbico	Sem definição	-	-	1 x 10 ⁵	-	-	-	-	-
TOTAL		1,6 x 10⁴	1,65 x 10⁵	1,42 x 10⁶	1,001 x 10⁶	6,75 x 10⁴	2,6 x 10⁵	9,5 x 10⁵	9,26 x 10⁵

Legenda: Macho, controle (n = 4), TEA (n = 4), TEA + WP (n = 6), WP (n = 6). Fêmea, controle (n = 7), TEA (n = 4), TEA + WP (n = 5), WP (n = 6). BGN, bactéria gram-negativa não especificada; BGP, bactéria gram-positiva não especificada; -, espécie ausente; U.F.C, unidades formadoras de colônias; TEA, transtorno do espectro autista; WP, whey protein.

De um modo geral, a cultura bacteriológica demonstrou pouca variedade taxonômica. Entretanto, em ambos os grupos suplementados com WP houve uma maior riqueza quanto a diversidade de crescimento de espécies. Nos grupos controle e TEA teve a predominância de apenas 5 espécies, já no TEA + WP e WP houve a presença de 9 espécies. Esses resultados foram semelhantes para machos e fêmeas.

Os grupos suplementados com WP (TEA + WP e WP) apresentaram crescimento dos seguintes gêneros bacterianos: *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Morganella* e *Klebsiella*. Já os grupos tratados com salina e VPA, apesar de outras bactérias serem encontrados em algumas amostras, tiveram predominantemente o crescimento de apenas duas espécies: *Escherichia coli* e *Enterococcus. Faecalis*. Desse modo, os grupos Controle e TEA não apresentaram grandes diferenças entre si, e, ambos tiveram uma menor diversidade quando comparado ao grupo suplementado.

Alguns achados interessantes valem a pena serem expostos: (1) a presença de *Lactobacillus spp.* apenas no grupo tratado com WP. Tal espécie está normalmente relacionada a funções imunes benéficas ao ambiente intestinal (ASHAOLU, 2019), (2) a bactéria *Escherichia coli* não teve crescimento detectado no grupo WP, tanto em machos como em fêmeas, contudo, ela teve grande predominância no restante dos grupos (controle, TEA e TEA + WP), e, (3) as espécies *Morganella morganii* e *Klebsiella oxytoca* cresceram apenas no grupo TEA + WP, em ambos os sexos.

A análise qualitativa dos dados quanto a diversidade entre os filos revelou que nos grupos controle e WP teve o predomínio de *Firmicutes*, já nos grupos TEA e TEA + WP de *Proteobacteria*. Além disso, a quantidade (U.F.C./g) de *Firmicutes* estava relativamente superior no grupo TEA + WP quando comparado ao grupo TEA. Tais achados foram encontrados em ambos os sexos (Tabela 4). Alguns trabalhos realizados em humanos e animais demonstram que a disbiose no TEA pode ser caracterizada é através do aumento dos filos *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* concomitantemente com a diminuição dos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria* (AL-AYADHI *et al.*, 2021). Portanto, no presente estudo, o tratamento com VPA induziu uma possível mudança na composição dessa microbiota, e o WP foi capaz de recuperar a contagem dessas bactérias do filo *Firmicutes* que não estavam presentes no grupo Controle.

Tabela 4. Distribuição da microbiota quanto ao filo.

Filo/colônias (U.F.C./g)	Macho				Fêmea			
	Controle	TEA	TEA+WP	WP	Controle	TEA	TEA+WP	WP
Proteobacteria	-	2×10^5	$5,9 \times 10^5$	-	$1,7 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	5×10^3
Firmicutes	$1,6 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$6,6 \times 10^5$	1×10^6	$5,05 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$9,21 \times 10^5$

Legenda: Macho, controle (n = 4), TEA (n = 4), TEA + WP (n = 6), WP (n = 6). Fêmea, controle (n = 7), TEA (n = 4), TEA + WP (n = 5), WP (n = 6). -, filo ausente; U.F.C., unidades formadoras de colônias; TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Em relação ao crescimento total de colônias quando avaliado pelo teste estatístico ANOVA seguido de Tukey, os grupos tratados com VPA e suplementados com WP tiveram crescimento significativamente maior quando comparado ao controle. Esse resultado foi similar em ambos os sexos (Figura 22). Portanto, tanto a diversidade (número de espécies) como a quantidade total de colônias foram maiores nos grupos suplementados quando comparado com controle e TEA ($p < 0,05$).

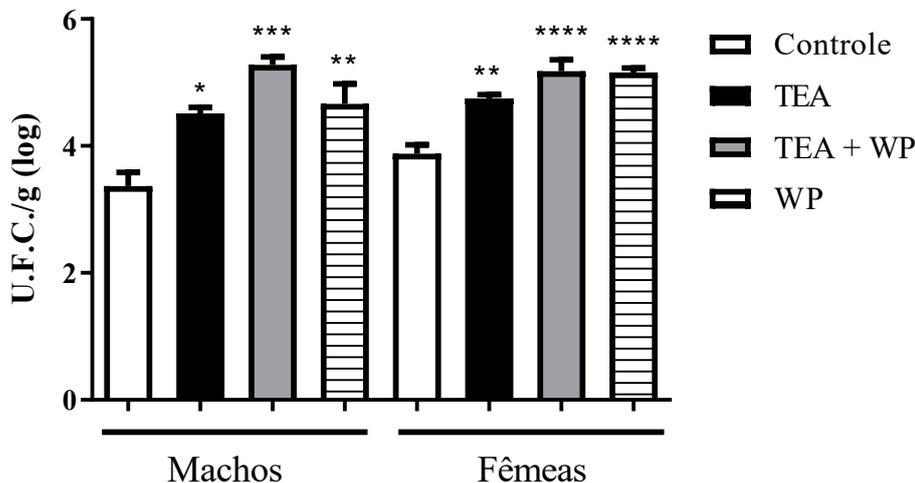


Figura 22 – Quantidade total de colônias nos diferentes grupos U.F.C./g (log). Animais machos e fêmeas tratados com ácido valproico (400 mg/kg) em dose única, e *whey protein* (1,24 mg/kg) durante 24 dias. ANOVA seguido do post-hoc de Tukey. Diferenças significativa entre os grupos e o controle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Valores expressos como média \pm SEM (4-7). U.F.C., unidades formadoras de colônias; Log, logaritmo; TEA, transtorno do espectro autista; WP, *whey protein*.

Outro resultado importante foi que nenhuma bactéria encontrada estava presente em quantidade considerada patológica. Os critérios específicos de diagnóstico de infecção pela contagem de U.F.C. variam de acordo com a espécie, em que se deve separar quais microrganismos fazem parte da microbiota normal e quais são considerados patogênicos. Pode-se adotar um valor $\geq 10^5$ U.F.C./g para não pertencentes e de $\geq 10^8$ U.F.C./g para bactérias pertencentes a microbiota intestinal quanto a presença de infecção (BRASIL, 2020).

6 DISCUSSÃO

Devido a sua composição de peptídeos bioativos e aminoácidos essenciais, o WP apresenta propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras que podem alterar benéficamente a microbiota intestinal, podendo ainda influenciar no desenvolvimento neurocomportamental (VASCONCELOS *et al.*, 2018; MOSTAJERAN *et al.*, 2020; NIELSEN *et al.*, 2020). O modelo de indução animal com VPA é comumente utilizado para promover mudanças neuroanatômicas e comportamentais características do autismo, modificando funções sistêmicas e neurológicas importantes, além disso, também é capaz de alterar a microbiota intestinal nesses animais (CHEN *et al.*, 2020; MORAKOTSRIWAN *et al.*, 2016). Desse modo, o presente trabalho investigou pela primeira vez a influência da suplementação de WP (1,24 mg/kg, 24 dias) em relação a indicadores bioquímicos, hematológicos e comportamentais, além da contagem de bactérias em ratos filhotes induzidos com disbiose e características ‘autísticas’ por meio da dose única de ácido valproico (PND14 – 400 mg/kg).

Os resultados demonstraram que, comparado ao controle, o VPA alterou: (1) parâmetros hematológicos, como diminuição de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito; (2) parâmetros bioquímicos, diminuição de albumina, globulina e proteína totais; (3) parâmetros comportamentais, diminuição de sociabilidade; (4) promoveu perda de peso; e, (5) alterou a microbiota intestinal (dado avaliado qualitativamente). Em sua maioria, essas alterações também são observadas em pacientes com TEA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Contudo, a suplementação com *whey protein* (1,24 mg/g de peso) durante 24 dias não conseguiu reverter tais mudanças, exceto no quesito sociabilidade. Em relação a microbiota, o WP a quantidade e recuperou a diversidade de espécies encontradas, indicando que esse suplemento funciona como substrato para crescimento de bactérias comensais da microbiota intestinal. Adicionalmente, o uso de WP teve o potencial de melhorar a memória dos filhotes, conforme avaliado no teste *Y-maze*.

6.1 Efeitos no peso corporal

Nos filhotes que receberam VPA, houve uma queda significativa do peso quando comparado ao grupo controle e WP. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos, em que o uso de VPA administrado tanto no pré-natal (nas fêmeas prenhas) como no pós-natal (na prole) é capaz de induzir a perda de peso em animais (ORNOY *et al.*, 2019; AL-ASKAR *et al.*, 2017; MATTOS *et al.*, 2020). Possivelmente, a alta dose de VPA dada aos filhotes ocasionou uma certa toxicidade com redução da ingestão e má nutrição (CHEN *et al.*,

2020). Essa toxicidade também pode ser parcialmente confirmada pelos resultados hematológicos e bioquímicos encontrados no presente estudo (Figuras 12 e 16). O VPA em altas doses é capaz de alterar o desenvolvimento do tubo neural, sendo considerado uma droga teratogênica promovendo mudanças comportamentais e déficits fisiológicos (VAJDA *et al.*, 2021).

Em alguns outros estudos, o grupo tratado com VPA, quando comparado ao salina, não apresentou alteração no peso (FERESHETYAN *et al.*, 2021; FAVRE *et al.*, 2013). Diferenças entre espécies, quantidade de animais por gaiola e concentrações da droga podem explicar essas divergências. Por exemplo, esse trabalho utilizou a dose de 400 mg/kg (PND14), já o estudo de Fereshetyan e colaboradores (2021) usou a dose de 200 mg/kg (PND5-12). Outro fator relevante é de que não está claro se esse padrão de perda de peso é característico do TEA ou apenas do modelo experimental usado (FAVRE *et al.*, 2015; ILES, 2021; ELNAHAS *et al.*, 2020). Em crianças com TEA pode haver tanto ganho como a perda de peso, já que cada indivíduo apresenta uma sintomatologia diferenciada conforme os déficits neurológicos apresentados (YU; ZHAO, 2021; RISTORI *et al.*, 2019; PUTS *et al.*, 2017).

Outro resultado encontrado foi que a suplementação com WP não reverteu a perda de peso provocada pelo uso do VPA, e, comparado ao controle, o WP não aumentou o peso dos filhotes (Figuras 10 e 11). No trabalho de Pérez-cano e colaboradores (2008), o tratamento com WP concentrado também não foi capaz de aumentar ou reduzir o peso dos animais. Dietas ricas em proteína estão associadas ao aumento da termogênese, e, conseqüentemente, aumento do gasto energético de repouso, se a dieta também apresentar diminuição calórica pode ocorrer um *shift* com preservação de massa muscular e menor estoque de triacilgliceróis gerando perda de peso (KASSIS *et al.*, 2019). Nesse trabalho, como não houve restrição de calorias, era de se esperar que os grupos suplementados (TEA + WP e WP) aumentassem seu peso, o que não foi observado, talvez o tempo de tratamento e quantidade de WP ofertada não tenha sido suficiente para alterar o balanço energético desses animais (BUMRUNGPART *et al.*, 2018; KÅRLUND *et al.*, 2019). Além disso, possa ser que o suplemento tenha aumentado a saciedade dos filhotes devido a sua modulação em hormônios anorexígenos a nível intestinal e central, como peptídeo semelhante ao glucagon-1 e peptídeo YY (ZAPATA *et al.*, 2017; ANWAR *et al.*, 2021).

Em outro trabalho, o uso de WP reduziu momentaneamente a ingestão alimentar de animais, contudo, a suplementação isolada com lactoalbumina e lactoferrina prolongou essa hipofagia, além de diminuir o ganho de peso e massa adiposa (ZAPATA *et al.*, 2017).

Portanto, os efeitos benéficos do suplemento quanto a massa corporal também pode ser atribuída a sua composição aminoacídica e suas concentrações. A lactoalbumina e lactoferrina estão associadas a diminuição do quociente respiratório alterando o gasto energético (SINGH *et al.*, 2020).

6.2 Efeitos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Neste estudo, a administração de VPA na dose de 400 mg/kg (PND14) promoveu queda das proteínas plasmáticas, bilirrubina direta, HDL-c e ácido úrico, além de causar diminuição de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Os parâmetros da função hepática e renal, assim como colesterol total, triacilgliceróis e glicose não sofreram mudanças. Diferentemente, no trabalho de Okhremchuk e colaboradores (2020), o uso prolongado de VPA (600 mg/kg) aumentou consideravelmente os valores de bilirrubina direta, ALT e glicemia. Em outro trabalho, a administração de VPA na gestação (600 mg/kg) não foi capaz de promover na prole alterações nas enzimas hepáticas ALT e AST (BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2010). No estudo de Ornoy *et al.* (2019), a administração de VPA, 300 mg/kg no PND4, promoveu toxicidade causando um aumento significativo da mortalidade de filhotes. Desse modo, o uso do VPA em altas doses pode causar toxicidade com o aumento ou a diminuição de parâmetros bioquímicos importantes através de danos a enzimas hepáticas (CHEN *et al.*, 2020; ELNAHAS *et al.*, 2020). Possa ser que a longo prazo e em altas doses, o VPA seja capaz de causar maiores agravos quando comparado a administração em doses únicas (ABDELKADER *et al.*, 2020; OKHREMCHUK *et al.*, 2020).

Cartocci e colegas (2019) avaliaram o efeito do VPA (ratos induzidos no pré-natal) quanto ao metabolismo do colesterol a nível hepático e central. Os autores observaram que VPA não promoveu nenhuma mudança significativa quanto ao colesterol plasmático, contudo, houve diminuição nas proteínas de membrana relacionadas com o transporte do colesterol em áreas específicas do cérebro. No nosso trabalho, o HDL-c do grupo tratado com VPA foi significativamente menor comparado ao controle e WP (Figura 14), indicando que essa droga, pelo menos em parte, é capaz de prejudicar o metabolismo lipídico. Além disso, a literatura demonstra que em altas doses e em fases iniciais do desenvolvimento embrionário esse fármaco é capaz de promover mudanças relevantes no metabolismo de animais (LARNER *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2020).

No presente estudo, a suplementação com *whey protein* não foi capaz de reverter as mudanças bioquímicas e hematológicas provocadas pelo VPA, e, o *whey protein* sozinho também não alterou significativamente nenhum parâmetro sanguíneo avaliado. Alguns

trabalham mostram que WP foi capaz de melhorar a contagem de hemácias, hemoglobina e o hematócrito, enquanto outros mostram que não houve alterações significativas (KARANDISH *et al.*, 2008; RONGHUI, 2015). O *whey protein* é composto por diversas frações proteicas bioativas incluindo glicomacropéptidos, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e lactoferrina que apresentam múltiplos benefícios contra câncer, infecção e inflamação. Por exemplo, a lactoferrina é capaz de estimular o crescimento de células de defesa, como leucócitos e macrófagos, beneficiando o sistema imunológico. O WP também apresenta todos os aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas, dentre eles cisteína e triptofano, importantes para a defesa antioxidante do organismo (VASCONCELOS *et al.*, 2018; ZAPATA *et al.*, 2017). Portanto, o WP apresenta diversas propriedades biológicas que podem influenciar processos bioquímicos em órgãos específicos no organismo, e, isso pode ou não ser visto em parâmetros bioquímicos e hematológicos, já que os estudos demonstram resultados controversos (MINJ; ANAND, 2020; KARANDISH *et al.*, 2008; RONGHUI, 2015).

6.3 Efeitos comportamentais

No presente estudo não houve alterações significativas entre os grupos quanto a locomoção e ansiedade avaliados pelo teste de campo aberto. Entretanto, os animais machos com TEA tiveram uma tendência a diminuir o número de cruzamentos e o levantamento nas quatro patas (Tabela 1), o mesmo não foi observado nas fêmeas possivelmente devido as diferenças neuroquímicas entre os sexos (GOUDA *et al.*, 2022; CARTOCCI *et al.*, 2019). Sabe-se que o TEA acomete 2-3x mais homens do que mulheres (ARBERAS; RUGGIERI, 2019). Essa tendência é confirmada por uma parte dos trabalhos encontrados na literatura, em que o uso do VPA ocasiona diminuição da locomoção e aumento da ansiedade (WAGNER *et al.*, 2006; ORNOY *et al.*, 2019). Outro estudo aponta resultado conflitante, em que o VPA aumentou a locomoção de animais quando comparado ao controle (LARNER *et al.*, 2021). É possível que nesse trabalho, o tamanho da amostra e análise estatística não tenham conseguido capturar o real efeito comportamental do ácido valproico quanto a esses parâmetros.

Em relação ao comportamento repetitivo e estereotipado analisado pelo teste de *marble burying* e frequência do *grooming* observada no teste de campo aberto, os animais desse estudo também não apresentaram diferenças significativas (Tabela 1 e 2). Resultados diferentes foram encontrados por outros autores, no qual o uso de VPA (principalmente no pré-natal) é capaz de induzir comportamento repetitivo (EISSA *et al.*, 2019; CHEN *et al.*,

2020). Distinções na metodologia podem justificar as diferenças de resultados relatadas, por exemplo, se o VPA foi administrado em dose única ou não, sua concentração e em qual período do desenvolvimento do animal, pré ou pós-natal (GANDHI; LEE, 2021; LARNER *et al.*, 2021).

Quanto ao teste de interação social, o VPA foi capaz de reduzir o tempo que os animais ficaram na câmera com animal, além de aumentar o tempo que eles ficaram na câmera sem animal, indicando diminuição na sua sociabilidade (Figura 20). Outros trabalhos demonstram resultados parecidos (MORAKOTSRIWAN *et al.*, 2016; ELNAHAS *et al.*, 2020; MATTOS *et al.*, 2020). Danos no hipocampo são prevalentes em indivíduos com TEA, e também são relatados nos modelos de indução com VPA (CRISTIANO *et al.*, 2022; ARBERAS; RUGGIERI, 2019; CHEN *et al.*, 2020). Essa região cerebral é essencial para o processamento da linguagem e semântica, além da criatividade e comportamento emocional. Desse modo, alterações a nível de hipocampo podem promover retardo da capacidade exploratória e social dos animais (TALEB *et al.*, 2021; SCHIAVI *et al.*, 2019; MAROTTA *et al.*, 2020).

No trabalho de Schiavi e colaboradores (2019), animais expostos ao VPA (pré-natal, dose única, 500 mg/kg) tiveram um aumento de receptores dopaminérgicos e a excitabilidade de neurônios presentes no núcleo arqueado quando comparado ao controle. É possível que o VPA provoque consequências quanto ao sistema de recompensa no cérebro no contexto social, no qual o animal não teria um interesse inicial de interagir com outros, prejudicando possíveis interações futuras. Isso indica que uma possível falha em regiões cerebrais específicas ao comportamento, como estrutura límbica, também pode estar relacionada a diminuição da sociabilidade presente em animais expostos ao VPA. Resultados semelhantes também são encontrados em humanos (MAROTTA *et al.*, 2020; PAVĀL; MICLUTIA, 2021).

Cristiano e colaboradores (2022) avaliaram o perfil inflamatório no hipocampo em camundongos induzidos com TEA (VPA, pré-natal, 500 mg/kg). Os autores observaram que o VPA foi capaz de aumentar citocinas pro-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e diminuir IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Além disso, resultados comportamentais indicaram diminuição de sociabilidade quando comparado ao controle. Em humanos, o TEA também promove neuroinflamação com aumento de citocinas pro-inflamatórias em algumas regiões cerebrais específicas (ANWAR *et al.*, 2021; MAROTTA *et al.*, 2020). Portanto, um perfil inflamatório a nível de SNC também pode estar relacionado aos comportamentos característicos desse transtorno (TALEB *et al.*, 2021; CRISTIANO *et al.*, 2022).

Outra explicação para os resultados comportamentais seria relacionada aos danos oxidativos provocados pelo VPA a nível de SNC. O VPA é capaz de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (TALEB *et al.*, 2021). Apesar dessas enzimas funcionarem protegendo o cérebro contra danos oxidativos, quando sua atividade é exacerbada podem elevar a formação de espécies reativas de oxigênio prejudicando a atividade neuronal (MATTOS *et al.*, 2020).

Desse modo, percebe-se que diferentes mecanismos estão relacionados aos parâmetros comportamentais observados em animais tratados com VPA, em que múltiplos neurotransmissores e regiões cerebrais parecem estar envolvidas (TAKEDA *et al.*, 2021; PUTS *et al.*, 2017; GANDHI *et al.*, 2021; CRISTIANO *et al.*, 2022; PUIG-LAGUNES *et al.*, 2021).

Um resultado principal desse trabalho foi que o uso de *whey protein* conseguiu reverter os efeitos provocados pelo VPA quanto ao tempo que os animais ficaram na câmara sem animal (machos) (Figura 21). Resultado parecido foi encontrado em camundongos tratados com *whey protein* (89,1% da dieta, durante 30 dias), no qual os animais melhoraram sua sociabilidade quando comparado ao controle (suplementado com caseína) (VEKOVISCHEVA *et al.*, 2018). Esse achado pode ser explicado por três hipóteses relacionadas com os benefícios do WP: (1) aumento da síntese de receptores de serotonina a nível de SNC, um neurotransmissor relacionado com estresse e sociabilidade, (2) melhora do estresse oxidativo, e, conseqüentemente, processos inflamatórios normalmente associados à fatores comportamentais presentes em transtornos neurológicos, e, (3) efeito positivo na microbiota intestinal que influenciaria em padrões comportamentais (eixo cérebro-intestino).

O *whey protein* é considerado fonte de triptofano, um aminoácido precursor da serotonina, e sua suplementação pode estar relacionada ao aumento dos receptores desse neurotransmissor no cérebro, melhorando sua captação e ação, podendo ter efeito benéfico no aumento da sociabilidade e diminuição do estresse (ASHAOLU, 2019; ZHU *et al.*, 2019; MOSTAJERAN *et al.*, 2020). A serotonina é um neurotransmissor envolvido em um amplo espectro de processos do sistema nervoso como sono, apetite e estresse (STASI; SADALLA; MILANI, 2019). No trabalho de Zhu e colegas (2019), a suplementação com *whey protein* hidrolisado (2 mg/kg/dia, durante 21 dias) em camundongos melhorou parâmetros inflamatórios com diminuição de IL-1 β e IL-6 no hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal. Além disso, quando o WP foi enriquecido com triptofano, esses resultados foram acentuados com melhora da parâmetros comportamentais, indicando a influência especificamente desse

aminoácido em processos inflamatórios e serotoninérgicos.

Outro fator relevante é o eixo cérebro-intestino e a sua relação com mudanças comportamentais. Danos a barreira epitelial provocada por processos inflamatórios crônicos aumentam a permeabilidade da mucosa e promovem uma reação imunológica sistêmica podendo interferir no comportamento (BERCIK *et al.*, 2011; LAVELLE; SOKOL, 2020; HUGHES; ROSE; ASHWOOD, 2018). O modelo utilizado nesse trabalho com VPA também está associado a mudanças na barreira intestinal com infiltração de linfócitos T e neutrófilos (FAVRE *et al.*, 2013). Resultados desse estudo indicam que WP melhorou a diversidade da microbiota, além de promover crescimento de *Lactobacillus spp.*, e predomínio do filo *Firmicutes*. Portanto, o uso de *whey protein* influenciou a composição da microbiota que pode ter alterado parâmetros imunológicos e comportamentais, contudo, apenas em um dos testes e em uma das observações essa relação foi verdadeira. Diferenças quanto ao tipo de fonte proteica, quantidade e tempo de suplementação podem ter relação com a melhora de fatores inflamatórios intestinais, e, conseqüentemente, comportamentais (ANWAR *et al.*, 2021; ASHAOLU, 2019; BOSCAINI *et al.*, 2021)

Em relação ao teste *Y-maze*, os resultados indicaram que o *whey protein* tem o potencial de aumentar a memória de trabalho, corroborando com outros trabalhos encontrados na literatura (YU; ZHAO, 2021; DALZUCHIO *et al.*, 2013). Os animais com memória de trabalho intacta, e, portanto, funções do córtex pré-frontal intactas, se lembrará dos braços visitados anteriormente e mostrará uma tendência maior a entrar em um braço que não foi visitado recentemente (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2018). O *whey protein* é uma proteína de alta qualidade que contém quantidades significativas de todos os aminoácidos essenciais necessários ao corpo humano, possivelmente melhorando a resposta imunológica e a capacidade antioxidante no cérebro, interferindo na memória e aprendizagem (BUMRUNGPART *et al.*, 2018; VESKOUKIS *et al.*, 2020).

6.4 Efeitos na microbiota

A microbiota intestinal pode ser considerada como um órgão metabólico de extrema importância para a saúde do indivíduo (ADAK; KHAN, 2019; AVILA; SOUTHARD-SMITH, 2022). Ela participa da regulação de vários processos metabólicos e tem papel central na homeostase da barreira intestinal, absorção de nutrientes e síntese de vitaminas e aminoácidos essenciais (KÅRLUND *et al.*, 2019; BUTEL *et al.*, 2018). No presente estudo, a suplementação de *whey protein* foi capaz de influenciar benéficamente a microbiota intestinal dos filhotes, com aumento tanto da diversidade como da quantidade de

colônias bacterianas encontradas quando comparado aos grupos controle e TEA (Tabela 3). Resultados semelhantes são encontrados na literatura (MONTEIRO *et al.*, 2016; MASARWI *et al.*, 2018).

Dietas ricas em proteínas aumentam o metabolismo de aminoácidos no colón podendo beneficiar o hospedeiro (BOSCAINI *et al.*, 2021; DIETHER; WILLING, 2019). Esses aminoácidos podem servir de substrato para as bactérias já presentes a nível intestinal, em que a sua fermentação pode gerar metabolitos com efeitos sistêmicos importantes (JOINT RESEARCH CENTER, 2018; GOMAA, 2020). Os principais gêneros capazes de fermentar proteínas são: *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Peptostreptococcus*, *Acidaminococcus*, *Veillonella*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Bacteroides* e *Staphylococcus* (DALLAS *et al.*, 2017). Amônia, aminas biogênicas e compostos fenólicos são exemplos de compostos gerados pela fermentação bacteriana de proteínas. Esses *by-products* podem influenciar em processos imunomodulatórios e neurológicos importantes, além de interferir na função da barreira intestinal (NIELSEN *et al.*, 2020; PICKARD *et al.*, 2017). No presente trabalho, os grupos suplementados com WP apresentaram algumas dessas espécies, como *Peptostreptococcus* e *Staphylococcus* (Tabela 3).

Nesse estudo, o grupo suplementado com WP apresentou maior quantidade de bactérias do filo Firmicutes e menor quantidade de bactérias do filo Proteobacteria, já no grupo tratado com VPA essa relação foi inversa (Tabela 4). Pesquisas recentes indicam que a presença de uma microbiota desbalanceada e a infiltração por linfócitos T na mucosa intestinal estão relacionadas com uma resposta imune alterada em indivíduos com TEA (ROSE *et al.*, 2018; FAVRE *et al.*, 2013). A presença de distúrbios gastrointestinais como diarreia e constipação também pode ser explicada, pelo menos em parte, pela presença de alterações da microbiota intestinal, que se manifesta através de composição anormal desses microrganismos (ROSE *et al.*, 2018; MADRA; RINGEL; MARGOLIS, 2020). A microbiota no TEA é normalmente caracterizada pela presença de alguns gêneros específicos como *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacteroidetes*, *Bacteroides* e *Desulfovibrio* (IGLESIAS-VÁZQUEZ *et al.*, 2020). Desse modo, a modificação na ingestão de nutrientes através da suplementação com WP poderia ser propícia no tratamento na mudança da composição da microbiota e melhora dos sintomas em indivíduos com TEA.

Um ponto relevante a ser falado é de que a suplementação com WP, em qualquer população, deve ser avaliada individualmente (VIDAL-LLETJÓS *et al.*, 2017). Diferenças na digestibilidade, fonte, quantidade e qualidade das proteínas ingeridas influencia na sua fermentação a nível intestinal e colônico, além de fatores individuais como idade, sexo e

estado de saúde (ASHAOLU, 2019). Em crianças predispostos geneticamente ao TEA, o uso de qualquer suplemento pode ter efeito contrário ao desejado (SANCTUARY *et al.*, 2018). O tratamento com WP seria vantajoso no contexto da recuperação da microbiota intestinal com melhora no estresse oxidativo naqueles indivíduos que apresentem disbiose e disfunção da permeabilidade intestinal (SÁNCHEZ-MOYA *et al.*, 2017; MEDINA-VERA *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019; SWIATECKA *et al.*, 2017).

7 LIMITAÇÕES

O presente trabalho apresentou algumas limitações. Nas análises hematológicas e bioquímicas teve-se um prejuízo considerável quanto ao número de amostras disponíveis, em que o n de cada grupo foi relativamente pequeno. Para tentar contornar esse viés, as amostras de machos e fêmeas foram somadas para as análises estatísticas, e, se pode ter uma noção quanto aos efeitos dos diferentes tratamentos nos animais.

Outra limitação apresentava foi relacionada ao teste de interação social, em que o aparato utilizado foi o de camundongos apesar dos animais serem ratos da linhagem Wistar. Entretanto, como os animais eram filhotes teve-se pouco prejuízo. Além disso, os resultados desse teste foram significativos entre os grupos, indicando diminuição da sociabilidade nos animais tratados com VPA. Outro ponto é de que teria sido interessante avaliar regiões cerebrais específicas quanto a concentrações de neurotransmissores e presença de estresse oxidativo, tais achados poderiam justificar os resultados comportamentais encontrados e acrescentariam ao estudo.

Quanto as análises microbiológicas, caso fosse utilizado uma metodologia de sequenciamento genético do microbioma dos animais talvez a riqueza de resultados seria maior. Apesar disso, as análises por culturas bacteriológicas também demonstraram resultados pertinentes, em que houve diferença entre os grupos tanto na quantidade quanto na diversidade de espécies encontradas. Finalmente, acreditamos que o estudo propôs uma abordagem válida sobre o modelo de indução com VPA no pós-natal, com resultados significativos em diversos parâmetros avaliados

8 CONCLUSÃO

A administração em dose única de ácido valproico causou danos relevantes quanto aos indicadores hematológicos, bioquímicos e comportamentais, além de alterar a microbiota intestinal. A suplementação com *whey protein* não conseguiu modificar a maioria dessas alterações e a sua administração isoladamente não alterou nenhum parâmetro sanguíneo. Além disso, o suplemento não conseguiu reverter a perda ponderal. Contudo, o *whey protein* foi capaz de melhorar o tempo que os ratos machos passaram na câmara sem animal, e potencializou significativamente a memória dos animais evidenciado pela diminuição do retorno e aumento da alternância entre os braços, em fêmeas e machos, respectivamente. O *whey protein* também recuperou a diversidade e aumentou quantidade do perfil bacteriológico encontrado, contribuindo beneficemente na composição da microbiota intestinal dos animais avaliados.

Portanto, esses achados sugerem que a suplementação com as proteínas solúveis do leite de vaca pode ser satisfatória quanto a composição da microbiota intestinal, além de melhorar parâmetros comportamentais. Novas pesquisas são necessárias para melhor entender quais aspectos neurofisiológicas e anatômicos no TEA estão relacionados a esses achados, além de clarificar inconsistências encontradas na literatura.

REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, N. F., ELYAMANY, M.; GAD, A. M.; ASSAF, N.; FAWZY, H. M.; ELESAWY, W. H. Ellagic acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, vol. 143, n. 1, p. 23-29, 2020.
- ADAK, A.; KHAN, M.R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Berna, vol. 76, n. 3, p. 473-493, 2019.
- ADAMS, J. B.; JOHANSEN, L. J.; POWELL, L. D.; QUIG, D.; RUBIN, R. A. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism - comparisons to neurotypical children and correlation with autism severity. **BMC Gastroenterology**, California, vol. 11, n. 22, p. 1-5, 2011.
- AL-ASKAR, M.; BHAT, R.S.; SELIM, M.; AL-AYADHI, L.; EL-ANSARY, A. Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism. **BMC Complementary Medicine**, Londres, vol. 17, n. 1, p. 259-260, 2017.
- AL-AYADHI, L.; ZAYED, N.; BHAT, R.S.; MOUBAYED, N.; AL-MUAMMAR, M.; EL-ANSARY, A. The use of biomarkers associated with leaky gut as a diagnostic tool for early intervention in autism spectrum disorder: a systematic review. **Gut Pathogens**, California, vol. 13, n. 54, p. 1-16, 2021.
- AL-OTAISH, H.; AL-AYADHI, L.; BJØRKLUND, G.; CHIRUMBOLO, S.; URBINA, M.A.; EL-ANSARY, A. Relationship between absolute and relative ratios of glutamate, glutamine and GABA and severity of autism spectrum disorder. **Metabolic Brain Disease**, Berna, 33, n. 3, p. 843-854, 2018.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5. ed. American Psychiatric Association: Washington, DC. p. 66-71, 2013.
- ANWAR, A.; QURATUL, A.; SAEED, A.; KHALID, W.; AHMED, M.; BOSTANI, A. Bio-molecular characteristics of whey proteins with relation to inflammation. *In: New Advances in the Dairy Industry*. 1. ed. IntechOpen: United Kingdom, 2021. Disponível em: <https://www.intechopen.com/online-first/77716>. Acesso em: 13 de jan. de 2022.
- ARBERAS, C.; RUGGIERI, V. Autism, genetic and biological aspects. **Medicina**. Bueno Aires, vol. 79, n. 1, p.16-21, 2019.
- ARBIZU, S.; CHEW, B.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; NORATTO, G. Commercial whey products promote intestinal barrier function with glycomacropptide enhanced activity in downregulating bacterial endotoxin lipopolysaccharides (LPS)-induced inflammation *in vitro*. **Food & Function**, Londres, vol. 11, n. 7, p. 5842-5852, 2020.
- ASHAOLU, T. J. Protein hydrolysates and their impact on gut microbiota: an editorial. **CPQ Medicine**, California, vol. 5, n. 4, p. 1-5, 2019.
- AVILA, J.A.; SOUTHARD-SMITH, E.M. In the enteric nervous system, it's all about connections. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, Bethesda , vol.

13, n. 1, p. 346-347, 2022.

BAMBINI-JUNIOR, V. **Estabelecimento de modelo animal de autismo por exposição pré-natal ao ácido valproico: parâmetros comportamentais e bioquímicos**. 2010. 52 f.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

BENJAMIN, J.; MAKHARIA, G.; AHUJA, V.; ANAND RAJAN, K.D.; KALAIVANI, M.; GUPTA, S.D.; JOSHI, Y.K. Glutamine and whey protein improve intestinal permeability and morphology in patients with Crohn's disease: a randomized controlled trial. **Digestive Diseases and Sciences**, Berna, vol. 57, p. 1000-1012, 2012.

BERCIK, P.; DENOU, E.; COLLINS, J.; JACKSON, W.; LU, J.; JURY, J.; DENG, Y.; BLENNERHASSETT, P.; MACRI, J.; MCCOY, K.D.; VERDU, E.F.; COLLINS, S.M. The intestinal microbiota affects central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. **Gastroenterology**, California, vol. 41, n. 2, p. 599-609, 2011.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. **Módulo 10 – Detecção dos principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos pelo laboratório de microbiologia clínica**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2020.

BOSCAINI, S.; CABRERA-RUBIO, R.; GOLUBEVA, A.; NYCHYK, O.; FÜLLING, C.; SPEAKMAN, J.R.; COTTER, P.D.; CRYAN, J.F.; NILAWEERA, K.N. Depletion of the gut microbiota differentially affects the impact of whey protein on high-fat diet-induced obesity and intestinal permeability. **Physiological Reports**, Pittsburgh, vol. 9, e14867, 2021.

BUMRUNGPET, A.; PAVADHGUL, P.; NUNTHANAWANICH, P.; SIRIKANCHAROD, A.; ADULBHAN, A. Whey Protein supplementation improves nutritional status, glutathione levels, and immune function in cancer patients: a randomized, double-blind controlled trial. **Journal of Medicinal Food**, Nova York, vol. 21, n. 6, p. 612-616, 2018.

BUTEL, M.J.; WALIGORA-DUPRIET, A.J.; WYDAU-DEMATTEIS, S. The developing gut microbiota and its consequences for health. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, Cambridge, vol. 9, n. 6, p. 590-597, 2018.

CARTOCCI, V.; TONINI, C.; DI PIPPO, T.; VUONO, F.; SCHIAVI, S.; MARINO, M.; TREZZA, V.; PALLOTTINI, V. Prenatal exposure to valproate induces sex-, age-, and tissue-dependent alterations of cholesterol metabolism: potential implications on autism. **Journal of Cellular Physiology**, Nova York, vol. 234, p. 4362-4374, 2019.

CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Center for Biologics Evaluation and Research. **Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers**. U.S. Food and Drug Administration: Rockville, Maryland, 2022.

CRISTIANO, C.; VOLPICELLI, F.; CRISPINO, M.; LACIVITA, E.; RUSSO, R.; LEOPOLDO, M.; CALIGNANO, A.; PERRONE-CAPANO, C. Behavioral, anti-inflammatory, and neuroprotective effects of a novel FPR2 agonist in two mouse models of autism. **Pharmaceuticals**, Berne, vol. 15, p. 16-18, 2022.

CHEN, O.; TAHMAZIAN, I.; FERRARA, H.J.; HU, B.; CHOMIAK, T. The early overgrowth theory of autism spectrum disorder: insight into convergent mechanisms from valproic acid exposure and translational models. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, Amsterdã, vol. 173, p. 275-300, 2020.

CRYAN, J.F., *et al.* The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**. Rockville, vol. 99, n. 4, p. 1877-2013, 2019.

DALLAS, D.C.; SANCTUARY, M.R.; QU, Y.; KHAJAVI, S.H.; VAN ZANDT, A.E.; DYANDRA, M.; FRESE, S.A.; BARILE, D.; GERMAN, J.B. Personalizing protein nourishment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Londres, vol. 57, p. 3313-3331, 2017.

DALZOCHIO, T.; CAON, L. S.; CARVALHO, L. S.; FEKSA, L. R.; TAVARES, R. G.; BERLESE, D. B. Efeitos da ingestão de suplementos alimentares e hormônio do crescimento sobre a ansiedade e memória em ratos Wistar. **Revista Digital**, Buenos Aires, vol. 17, n. 176, p. 1-6, 2013.

DEMIR, A.Ç.; ÖZCAN, Ö. The nutritional behavior of children with autism spectrum disorder, parental feeding styles, and anthropometric measurements. **Nordic Journal of Psychiatry**, Londres, vol. 76, n. 1, p. 64-70, 2022.

DIEHL, H. R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABEMAMPANEMA, Y.; SMITH, D.; VIDAL, J. M.; VAN DE VORSTENBOSCH, C. A. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routs and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, Nova York, vol. 21, p. 15-23, 2001.

DIETHER, N.E.; WILLING, B.P. Microbial fermentation of dietary protein: an important factor in diet-microbe-host interaction. **Microorganisms**, Basileia, vol. 7, n. 1, p. 19-20, 2019.

DONOVAN, S. M. Human milk proteins: composition and physiological significance. **Nestlé Nutrition Institute Workshop Series Home**, Basileia, vol. 90, p. 93-101, 2019.

EISSA N.; AZIMULLAH, S.; JAYAPRAKASH, P.; JAYARAJ, R. L.; REINER, D.; OJHA, S. K.; BEIRAM, R.; STARK, H.; ŁAŻEWSKA, D.; KIEĆ-KONONOWICZ, K.; SADEK, B. The dual-active histamine H3 receptor antagonist and acetylcholine esterase inhibitor E100 ameliorates stereotyped repetitive behavior and neuroinflammation in sodium valproate induced autism in mice. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdã, vol. 312, 108775, 2019.

ELNAHAS, E. M.; ABUELEZZ, S. A.; MOHAMAD, M. I.; NABIL, M. M.; ABDELRAOUF, S. M.; BAHAA, N.; HASSAN, G. A.; IBRAHIM, E. A.; AHMED, A. I.; ABOUL-FOTOUH, S. Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: a behavioral and neurobiological study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Amsterdã, v. 108, p. 110185, 2020.

EL-TA'ALU, A. B.; ALHASSAN, A. J.; FAGE, R. I. Ontogenetic developmental stages as common methods of relating the age of wistar rats with humans. **Nigerian Journal of Basic**

and Applied Sciences, Sokoto, vol. 23, n. 2, p. 179-184, 2015.

FAVRE, M.R.; BARKAT, T. R.; LaMENDOLA, D.; KHAZEN, G.; MARKRAM, H.; MARKRAM, K. General development health in the VPA-rat model of autism. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, vol 7, n. 88, p. 1-11, 2013.

FAVRE, M.R.; LA MENDOLA, D.; MEYSTRE, J.; CHRISTODOULOU, D.; COCHRANE, M.J.; MARKRAM, H.; MARKRAM, K. Predictable enriched environment prevents development of hyper-emotionality in the VPA rat model of autism. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, vol 2, n. 9, p. 127, 2015.

FERREIRO, B.; LLOPIS-SALINERO, S.; LARDIES, B.; GRANADOS-COLOMINA, C.; MILÀ-VILLARROEL, R. Clinical and nutritional impact of a semi-elemental hydrolyzed whey protein diet in patients with active crohn's disease: a prospective observational study. **Nutrients**. Basileia, vol. 13, n. 10, p. 3623, 2021.

FERESHETIAN, K.; CHAVUSHYAN, V.; DANIELYAN, M.; YENKOYAN, K. Assessment of behavioral, morphological and electrophysiological changes in prenatal and postnatal valproate induced rat models of autism spectrum disorder. **Nature: scientific reports**, Londres, vol. 11, p. 23471, 2021.

FILE, S. E.; HYDE, J. R. Can social interaction be used to measure anxiety? **British Journal of Pharmacology**, Londres, vol. 62, n. 1, p. 19-24, 1978.

GANDHI, T.; LEE, C. C. Neural mechanisms underlying repetitive behaviors in rodent models of autism spectrum disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Lausanne, vol. 14, 592710, 2021.

GOMAA, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Berne, vol. 113, n. 12, p. 2019-2040, 2020.

GOUDA, B.; SINHA, S.N.; CHALAMAIAH, M.; VAKDEVI, V.; SHASHIKALA, P.; VEERESH, B.; SUREKHA, V.M.; KASTURI, V.; BOIROJU, N.K. Sex differences in animal models of sodium-valproate-induced autism in postnatal BALB/C mice: whole-brain histoarchitecture and 5-HT_{2A} receptor biomarker evidence. **Biology**, Basileia, vol. 11, p. 79, 2022.

HILLS, R. D. JR; PONTEFRACT, B. A.; MISHCON, H. R.; BLACK, C. A.; SUTTON, S. C.; THEBERGE, C. R. Gut microbiome: profound implications for diet and disease. **Nutrients**. Basileia, vol. 11, n. 7, p. 1613-1614, 2019.

HUGHES, H. K.; ROSE, D.; ASHWOOD, P. The gut microbiota and dysbiosis in autism spectrum disorders. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, Berne, vol. 18, n. 11, p. 81, 2018.

IGLESIAS-VÁZQUEZ, L.; VAN GINKEL RIBA, G.; ARIJA, V.; CANALS, J. Composition of gut microbiota in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, Basileia, vol. 12, n. 3, p. 792, 2020.

ILES, A. Autism spectrum disorders. **Primary Care**, Amsterdã, vol. 48, n. 3, p. 461-473,

2021.

JUNIOR, E.M.L.; BANDEIRA, T. J. P.; MIRANDA, M. J. B.; FERREIRA, G. E.; PARENTE, E. A.; PICCOLO, N. S.; FILHO, M. O. M. Caracterização da microbiota da pele e cavidade oral de *Oreochromis niloticus*. **Journal of Health and Biological Sciences**, Fortaleza, vol. 4, n. 3, p. 193-197, 2016.

JOINT RESEARCH CENTER (JRC). Knowledge for Health and Consumer Safety, **The human gut microbiota: overview and analysis of the current scientific knowledge and possible impact on healthcare and well-being**. EUR 29240 EN, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2018.

KARANDISH, M.; ESLAMI, S.; MARANDI, S.; ZAND-MOGHADDAM, A.; HAGHIGHIZADEH, M. Effects of whey protein supplementation on hematological parameters after resistance exercise in healthy young athletes. **International Journal of Educational Methodology**, Hanover, vol. 10, p. 373-379, 2018.

KÅRLUND, A.; GÓMEZ-GALLEGO, C.; TURPEINEN, A.M.; PALO-OJA, O.M.; EL-NEZAMI, H.; KOLEHMAINEN, M. Protein supplements and their relation with nutrition, microbiota composition and health: is more protein always better for sportspeople? **Nutrients**, Basileia, vol. 11, n. 4, p. 829, 2019.

KASSIS, A.; GODIN, J.P.; MOILLE, S.E.; NIELSEN-MOENNOZ, C.; GROULX, K.; OQUEY-ARAYMON, S.; PRAPLAN, F.; BEAUMONT, M.; SAUSER, J.; MONNARD, I.; KAPP, A. F.; AMMON-ZUFFEREY, C.; FREI, N.; GUIGNARD, L.; DELODDER, F.; MACE, K. Effects of protein quantity and type on diet induced thermogenesis in overweight adults: A randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**, Amsterdã, vol. 38, n. 4, p.1570-1580, 2019.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. **Methods in Molecular Biology**, Amsterdã, vol. 1916, p. 105-111, 2018.

LARNER, O.; ROBERTS, J.; TWISS, J.; FREEMAN, L. A need for consistency in behavioral phenotyping for ASD: analysis of the valproic acid model. **Autism Research and Treatment**, Washington, ID 8863256, p. 1-10, 2021.

LAVELLE, A.; SOKOL, H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, Berlim, vol. 17, n. 4, p. 223-237, 2020.

LOTHIAN, J. B.; GREY, V.; LANDS, L. C. Effect of whey protein to modulate immune response in children with atopic asthma. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Londres, vol. 57, n. 3, p. 204-11, 2006.

MADRA, M.; RINGEL, R.; MARGOLIS, K.G. Gastrointestinal issues and autism spectrum disorder. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, Washigton, vol. 29, n. 3, p. 501-513, 2020.

MAROTTA, R.; RISOLEO, M.C.; MESSINA, G.; PARISI, L.; CAROTENUTO, M.; VETRI,

L.; ROCCELLA, M. The neurochemistry of autism. *Brain Science*, Basileia, vol. 10, n. 3, p. 163, 2020.

MASARWI, M.; SOLNIK, H.I.; PHILLIP, M.; YARON, S.; SHAMIR, R.; PASMANTIC-CHOR, M.; GAT-YABLONSKI, G. Food restriction followed by refeeding with a casein- or whey-based diet differentially affects the gut microbiota of pre-pubertal male rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Amsterdã, vol. 51, p. 27-39, 2018.

MATTOS, B. S.; SOARES, M. S. P.; SPOHR, L.; PEDRA, N. S.; TEIXEIRA, F. C.; SOUZA, A. A.; STEFANELLO, F. M.; BALDISSARELLI, J.; GAMARO, G. D.; SPANEVELLO, R. M. Quercetin prevents alterations of behavioral parameters, delta-aminolevulinic dehydratase activity, and oxidative damage in brain of rats in a prenatal model of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Nova York, vol. 80, p. 287-302, 2020.

MEDINA-VERA, I.; SANCHEZ-TAPIA, M.; NORIEGA-LÓPEZ, L.; GRANADOS-PORTILLO, O.; GUEVARA-CRUZ, M.; FLORES-LÓPEZ, A.; AVILA-NAVA, A.; FERNÁNDEZ, M. L.; TOVAR, A. R.; TORRES, N. A dietary intervention with functional foods reduces metabolic endotoxaemia and attenuates biochemical abnormalities by modifying faecal microbiota in people with type 2 diabetes. **Diabetes & Metabolism**, Amsterdã, vol. 45, n. 2, p. 122-131, 2019.

MILANI, C.; DURANTI, S.; BOTTACINI, F.; CASEY, E.; TURRONI, F.; MAHONY, J.; BELZER, C.; DELGADO PALACIO, S.; ARBOLEYA MONTES, S.; MANCABELLI, L.; LUGLI, G. A.; RODRIGUEZ, J. M.; BODE, L.; DE VOS, W.; GUEIMONDE, M.; MARGOLLES, A.; VAN SINDEREN, D.; VENTURA, M. First microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, vol. 81, n. 4, p. 36-17, 2017.

MINJ, S.; ANAND, S. Whey proteins and its derivatives: bioactivity, functionality, and current applications. **Dairy**, Basileia, vol. 1, p. 233-258, 2020.

MONTEIRO, N. E. S.; ROQUETTO, A. R.; DE PACE, F.; MOURA, C. S.; DOS SANTOS, A.; YAMADA, A. T.; SAAD, M. J. A.; AMAYA-FARFAN, J. Dietary whey proteins shield murine cecal microbiota from extensive disarray caused by high-fat diet. **Food Research International**, Amsterdã, vol. 85, p.121-130, 2016.

MORAKOTSRIWAN, N.; WATTANATHORN, J.; KIRISATTAYAKUL, W.; CHAISIWAMONGKOL, K. Autistic-like behaviors, oxidative stress status, and histopathological changes in cerebellum of valproic acid rat model of autism are improved by the combined extract of purple rice and silkworm pupae. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Londres, vol. 1, p. 1-10, 2016.

MOSTAJERAN, Z.; MOSAVAT, S.H.; NAJAFI, M.; EMTIAZY, M.; HASHEMPUR, M.H. Whey Protein (*Ma'aljobon*) as a complementary therapy for treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a randomized open-label controlled clinical trial. **Galen Medical Journal**, Londres, vol. 9, e1690, 2020.

NAKAMURA, K.; OGAWA, S.; DAIRIKI, K.; FUKATSU, K.; SASAKI, H.; KANEKO, T.; YAMAJI, T. A new immune-modulating diet enriched with whey-hydrolyzed peptide, fermented milk, and isomaltulose attenuates gut ischemia-reperfusion injury in mice. **Clinical**

Nutrition, Amsterdã, vol. 30, p. 513-516, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 7 ed. Washington: The National Academies Press; 2010.

NAGPAL, R.; WANG, S.; SOLBERG WOODS, L.C.; SESHIE, O.; CHUNG, S.T.; SHIVELY, C.A.; REGISTER, T.C.; CRAFT, S.; MCCLAIN, D.A.; YADAV, H. Comparative microbiome signatures and short-chain fatty acids in mouse, rat, non-human primate, and human feces. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, vol. 9, p. 2897, 2018.

NEVES, J.H.; BUSS, L.H.M.; BECK, R.G. **Prevalência de dados de transtorno do espectro autista no município de Armazém – SC**. 8 f. Monografia (Curso de Educação Física – Licenciatura) – Programa de Graduação. Universidade do Sul de Santa Catarina, Santa Catarina, 2021. Disponível em: <<https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/14049?mode=full>>. Acesso em: 29 de jan. de 2022.

NIELSEN, C. H.; HUI, Y.; NGUYEN, D. N.; AHNFELDT, A. M.; BURRIN, D. G.; HARTMANN, B.; HECKMANN, A. B.; SANGILD, P. T.; THYMANN, T.; BERING, S. B. Alpha-lactalbumin enriched whey protein concentrate to improve gut, immunity and brain development in preterm pigs. **Nutrients**. Basileia, vol. 12, n. 1, p. 245, 2020.

OKHREMCHUK, L.V.; SEMINSKIY, I. Z.; DARENSKAYA, M. A., KOLESNIKOVA, L. I.; KOLESNIKOV, S. I. Changes in the biochemical parameters of rat blood when administering toxic doses of sodium valproate. **International Journal of Biomedicine**. Estocolmo, vol. 10, n. 3, p. 266-269, 2020.

OPAS/OMS Brasil. Folha informativa: **Transtorno do espectro autista**. BRASIL: 2017. Disponível em: <<https://www.paho.org/bra/index.php?Itemid=1098>>. Acesso em: 25 de agosto de 2019.

ORNOY, A.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; TFILIN, M.; ERGAZ, Z.; YANAI, J.; SZYF, M.; TURGEMAN, G. S-adenosyl methionine prevents ASD like behaviors triggered by early postnatal valproic acid exposure in very young mice. **Neurotoxicology and Teratology**. Amsterdã, vol. 71, p. 64-74, 2019.

PAVĀL, D.; MICLUTIA, I. V. The dopamine hypothesis of autism spectrum disorder revisited: current status and future prospects. **Developmental Neuroscience**, Basileia, vol. 43, n. 2, p. 73-83, 2021.

PAULA, C. S.; RIBEIRO, S. H.; FOMBONNE, E.; MERCADANTE, M. T. Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in brazil: a pilot study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, Berna, vol. 41, p. 1738-1742, 2011.

PÉREZ-CANO, F. J.; MARÍN-GALLÉN, S.; CASTELL, M.; RODRÍGUEZ-PALMERO, M.; RIVERO, M.; CASTELLOTE, C.; FRANCH, A. Supplementing suckling rats with whey protein concentrate modulates the immune response and ameliorates rat rotavirus-induced diarrhea. **Journal of Nutrition**, Oxford, vol. 138, n. 12, p. 2392-2398, 2008.

PICAUD, J.C.; PAJEK, B.; ARCISZEWSKA, M.; TARCZÓN, I.; ESCRIBANO, J.;

PORCEL, R.; ADEL, T.; HASSINK, E.; RIJNIESE, A.; ABRAHAMSE-BERKEVELD, M.; KORCZOWSKI, B. An infant formula with partially hydrolyzed whey protein supports adequate growth and is safe and well-tolerated in healthy, term infants: a randomized, double-blind, equivalence trial. **Nutrients**, Basileia, vol. 12, n. 7, p. 2072, 2020.

PICKARD, J.M.; ZENG, M.Y.; CARUSO, R.; NÚÑEZ, G. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. **Immunological Reviews**, Nova York, vol. 279, n. 1, p. 70-89, 2017.

PUIG-LAGUNES, A. A.; ROCHA, L.; MORGADO-VALLE, C.; BELTRÁN-PARRAZAL, L.; LÓPEZ-MERAZ, M. L. Brain and plasma amino acid concentration in infant rats prenatally exposed to valproic acid. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, São Paulo, vol. 92, n. 2, e20190861, 2021.

PUTS, N.A.J.; WODKA, E.L.; HARRIS, A.D.; CROCETTI, D.; TOMMERDAHL, M.; MOSTOFKY, S.H.; EDDEN, R.A.E. Reduced GABA and altered somatosensory function in children with autism spectrum disorder. **Autism Research**, Nova York, vol. 10, n. 4, p. 608-619, 2017.

RADYUSHKIN, K.; HAMMERSCHMIDT, K.; BORETIUS, S.; VAROQUEAUX, F.; EL-KORDI, A.; RONNENBER, G. A.; WINTER, D.; FRAHM, J.; FISCHER, J.; BROSE, N.; EHRENREICH, H. Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. **Genes, Brain and Behavior**, Nova York, v. 8, p. 416-425, 2019.

RATAJCZAK, W.; RYŁ, A.; MIZERSKI, A.; WALCZAKIEWICZ, K.; SIPAK, O.; LASZCZYŃSKA, M. **Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs)**. *Acta Biochimica Polonica*, Varsóvia, vol. 66, n. 1, p. 1-12, 2019.

RHEE, S. H.; POTHOUKAKIS, C.; MAYER, E. A. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, Londres, vol. 6, p. 306-314, 2009.

RISTORI, M.V.; QUAGLIARIELLO, A.; REDDEL, S.; IANIRO, G.; VICARI, S.; GASBARRINI, A.; PUTIGNANI, L. Autism, gastrointestinal symptoms and modulation of gut microbiota by nutritional interventions. **Nutrients**. Basileia, vol. 11, n. 11, p. 2812, 2019.

RONGHUI, S. The research on the anti-fatigue effect of whey protein powder in basketball training. **Open Biomedical Engineering Journal**, Sharjah, vol. 9, p. 330-334, 2015.

ROSE, D. R.; YANG, H.; SERENA, G.; STURGEON, C.; MA, B.; CAREAGA, M.; HUGHES, H. K.; ANGKUSTSIRI, K.; ROSE, M.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; VAN DE WATER, J.; HANSEN, R. L.; RAVEL, J.; FASANO, A.; ASHWOOD, P. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. **Brain, Behavior, and Immunity**, Amsterdã, vol. 70, p. 354-368, 2018.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, Berne, vol. 9, p. 313-323, 2019.

SÁNCHEZ-MOYA, T.; LÓPEZ-NICOLÁS, R.; PLANES, D.; GONZÁLEZ-BERMÚDEZ, C. A.; ROS-BERRUZO, G.; FRONTELA-SASETA, C. In vitro modulation of gut microbiota by whey protein to preserve intestinal health. **Food & Function**, Londres, vol. 8, p. 3053-63, 2017.

SANCTUARY, M.R.; KAIN, J.N.; ANGKUSTSIR, I.K.; GERMAN, J.B. Dietary considerations in autism spectrum disorders: the potential role of protein digestion and microbial putrefaction in the gut-brain axis. **Frontiers in Nutrition**, Lausanne, vol. 5, p. 40, 2018.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D.N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist β -carbolines. **Psychopharmacology**, Berlim, vol. 94, p. 491-495, 1988.

SHI, N.; LI, N.; DUAN, X.; NIU, H. **Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system**. Military Medical Research, Londres, vol. 27, n. 4, p. 14-15, 2017.

SCHIAVI, S.; LEZZI, D.; MANDUCA, A.; LEONE, S.; MELANCIA, F.; CARBONE, C.; PETRELLA, M.; MANNAIONI, G.; MAIS, A.; TREZZA, V. Reward-related behavioral, neurochemical and electrophysiological changes in a rat model of autism based on prenatal exposure to valproic acid. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Lausanne, vol. 13, n. 479, p. 1-14, 2019.

SILVA, Y.P.; BERNARDI, A.; FROZZA, R.L. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, 2020, vol.11, p. 25-27, 2020.

SINGH, A.; ZAPATA, R.C.; PEZESHKI, A.; KNIGHT, C.G.; TUOR, U.I.; CHELIKANI, P.K. Whey Protein and its components lactalbumin and lactoferrin affect energy balance and protect against stroke onset and renal damage in salt-loaded, high-fat fed male spontaneously hypertensive stroke-prone rats. **Journal of Nutrition**, Oxford, vol. 150, n. 4, p. 763-774, 2020.

SPRONG, R. C.; SCHONEWILLE, A. J.; VAN DER MEER, R. Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: role of mucin and microbiota. **Journal of Dairy Science**, Amsterdã, vol. 93, p. 1364-1371, 2010.

STASI, C.; SADALLA, S.; MILANI, S. The relationship between the serotonin metabolism, gut-microbiota and the gut-brain axis. **Current Drug Metabolism**, Sharjah, vol. 20, n. 8, p. 646-655, 2019.

SWIATECKA, D.; ZLOTKOWSKA, D.; MARKIEWICZ, L. H.; SZYC, A. M.; WRÓBLEWSKA, B. Impact of whey proteins on the systemic and local intestinal level of mice with diet induced obesity. **Food & Function**, Londres, vol. 8, p. 1708-1710, 2017.

TAKEDA, K.; WATANABE, T.; OYABU, K.; TSUKAMOTO S OBA, Y.; NAKANO, T.; KUBOTA, K.; KATSURABAYASHI, S.; IWASAKI, K. Valproic acid-exposed astrocytes impair inhibitory synapse formation and function. **Nature: scientific reports**, Londres, vol. 11, n. 1, p. 23-25, 2021.

TALEB, A.; LIN, W.; XU, X.; ZHANG, G.; ZHOU, Q.G.; NAVEED, M.; MENG, F.; FUKUNAGA, K.; HAN, F. Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdã, vol. 137, 111322, 2021.

TIFFANY, C.R.; BÄUMLER, A.J. Dysbiosis: from fiction to function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, Rockville, vol. 317, n. 5, p. 602-608, 2019.

TREIT, D.; PINEL, J. P. J.; FIBIGER, H. C. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Amsterdã, v. 15, n. 4, p. 619-626, 1981.

VAJDA, F. J. E.; O'BRIEN, T. J.; GRAHAM, J. E.; HITCHCOCK, A. A.; PERUCCA, P.; LANDER, C. M.; EADIE, M. J. Folic acid dose, valproate, and fetal malformations, **Epilepsy & Behavior**, Amsterdã, vol. 114, n. (Pt A), p. 107569, 2021.

VASCONCELOS, Q. D. J. S.; BACHUR, T. P. R.; ARAGAO, G. F. Whey protein: composição, usos e benefícios – uma revisão narrativa. **European Journal of Physical Education and Sport Science**, Bucareste, vol. 4, n. 1, p. 173-183, 2018.

VEKOVISCHEVA, O. Y.; PEUHKURI, K.; BÄCKSTRÖM, P.; SIHVOLA, N.; PILVI, T.; KORPELA, R. The effects of native whey and α -lactalbumin on the social and individual behaviour of C57BL/6J mice. **British Journal of Nutrition**, Londres, vol. 110, n. 7, p. 1336-1346, 2013.

VESKOUKIS, A. S.; KERASIOTI, E.; SKAPERDA, Z.; PAPAPOSTOLOU, P. A.; NEPKA, C.; SPANDIDOS, D. A.; ASPRODINI, E.; TAITZOGLOU, I.; KOURETAS, D. Whey protein boosts the antioxidant profile of rats by enhancing the activities of crucial antioxidant enzymes in a tissue-specific manner. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdã, vol.142, p. 111508, 2020.

VIDAL-LLETJÓS, S.; BEAUMONT, M.; TOMÉ, D.; BENAMOUZIG, R.; BLACHIER, F.; LAN, A. Dietary protein and amino acid supplementation in inflammatory bowel disease course: what impact on the colonic mucosa? **Nutrients**, Basileia, vol. 9, p. 310-312, 2017.

YU, Y.; ZHAO, F. Microbiota-gut-brain axis in autism spectrum disorder. **Journal of Genetics and Genomics**, Amsterdã, vol. 48, n. 9, p. 755-762, 2021.

YU, X. C.; LI, Z.; LIU, X. R.; HU, J. N.; LIU, R.; ZHU, N.; LI, Y. The antioxidant effects of whey protein peptide on learning and memory improvement in aging mice models. **Nutrients**, Berna, vol. 13, n. 6, p. 2100-2104, 2021.

WALKER, W. A. **Dysbiosis in: the microbiota in gastrointestinal pathophysiology**. 1 ed. Massachusetts: Academic Press, p. 227-232, 2017.

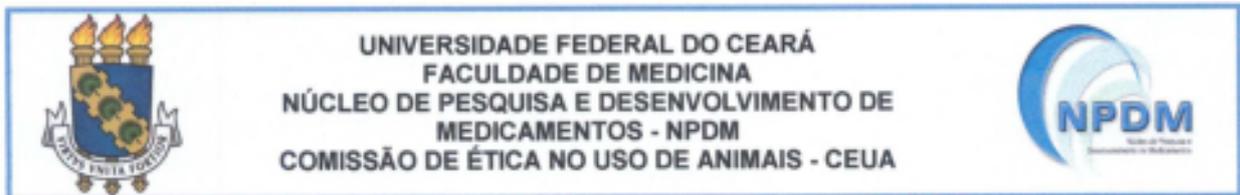
WAGNER, G. C.; REUHL, K. R.; CHEH, M.; MCRAE, P.; HALLADAY, A. K. A new neuro behavioral model of autism in mice: pre and postnatal exposure to sodium valproate. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, Berna, vol. 36, n. 6, p. 779-793, 2006.

ZAPATA, R. C.; SINGH, A.; PEZESHKI, A.; NIBBER, T.; CHELIKANI, P. K. Whey protein components – lactalbumin and lactoferrina – improve energy balance and metabolism. **Nature: scientific reports**, Londres, vol. 7, 9917, 2017.

ZHAO, J.; ZHANG, X.; LIU, H.; BROWN, M.A.; QIAO, S. Dietary protein and gut microbiota composition and function. **Current Protein & Peptide Science**, Sharjah, vol. 20, n. 2, p.145-154, 2019.

ZHU, X.; TAO, Q.; SUN-WATERHOUSE, D.; LI, W.; LIU, S.; CUI, S. γ -[Glu] $_n$ -Trp ameliorates anxiety/depression-like behaviors and its anti-inflammatory effect in an animal model of anxiety/depression. **Food & function**, Londres, vol. 9, p. 1-9, 2019.

ANEXO – Aprovação pelo comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 FACULDADE DE MEDICINA
 NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE
 MEDICAMENTOS - NPDM
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "USO DE WHEY PROTEIN PARA TRATAR DISBIOSE DE RATOS WISTAR COM SINTOMAS DE AUTISMO INDUZIDOS POR ÁCIDO VALPRÓICO.", registrada com o protocolo 20041119-0, sob a responsabilidade de Gislei Frota Aragão e Quezia Damaris Jones Severino Vasconcelos que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 12 / 12 / 2019.

We hereby certify that the project entitled "USE OF WHEY PROTEIN ON THE TREATMENT OF DYSBIOSIS IN WISTAR RATS WITH AUTISM SYMPTOMS INDUCED BY VALPROIC ACID.", identified by the protocol number 20041119-0, and conducted by Gislei Frota Aragão and Quezia Damaris Jones Severino Vasconcelos which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo Chordata, sub-vertebrate Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching) - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in a meeting of 12 / 12 / 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: JANEIRO/2020 Fim: JULHO/2021
Espécie	Rattus Norvegicus
Linhagem	Wistar
Nº de animais autorizados	64
Peso	20-40 g
Idade	10 semanas
Sexo	Fêmea/Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 20 de dezembro de 2019


 Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais
 do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de
 Medicamentos da Universidade Federal do Ceará