



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**DOSAGEM DE VITAMINA D EM CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO
AUTISTA**

PALOMA FRAGOSO DORNELAS DE MORAIS

Brasília – DF
2021

PALOMA FRAGOSO DORNELAS DE MORAIS

DOSAGEM DE VITAMINA D EM CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO
AUTISTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção ao grau de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ciências Aplicadas em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Riccardo Pratesi

Brasília- DF
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

MORAIS, PALOMA FRAGOSO
Md DOSAGEM DE VITAMINA D EM CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA / PALOMA FRAGOSO MORAIS; orientador Dr.
Riccardo Pratesi; co-orientador Dra. karina Nascimento
Costa. -- Brasília, 2021.
38 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Vitamina D. I.
Pratesi, Dr. Riccardo, orient. II. Costa, Dra. karina
Nascimento, co-orient. III. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

PALOMA FRAGOSO DORNELAS DE MORAIS

DOSAGEM DE VITAMINA D EM CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO
AUTISTA

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Riccardo Pratesi (Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Rosa Harumi Uenishi (Membro)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Mariana Vieira da Fonseca (Membro)
Secretaria do Estado de Saúde – SES DF

Profa. Dra. Lenora Gandolfi (Suplente)
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por toda inspiração e aos meus pacientes pela força motivadora da busca de novos conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pois sem sua inspiração nada em minha vida seria possível. À toda minha família pelo incentivo emocional e financeiro para eu chegar até aqui.

Ao meu esposo Nauberto e a meu filho Felipe pelos tempos de ausência que foram necessários para dedicar-me a este trabalho.

Ao meu sábio e sempre presente orientador, Professor Dr. Riccardo Pratesi, por sua paciência, bom humor, dedicação e experiência. Ajudou-me a realizar esse trabalho de forma mais suave e prazerosa.

À minha tão afetuosa e competente co-orientadora Professora Dra. Karina Nascimento Costa por cada detalhe corrigido nessa jornada.

À querida Geysa Stéfanne, por sua imprescindível contribuição nas análises laboratoriais, assim como, os conselhos e ajuda nos momentos de dificuldade.

À Professora Dra. Lenora Gandolfi por ter me apresentado ao Professor Dr. Pratesi.

A toda equipe do Laboratório Interdisciplinar de Biociência, em especial a Danielle por ter sido sempre prestativa e Aparecida pelo auxílio na análise estatística dos dados coletados.

Aos pacientes e familiares que aceitaram, de forma voluntária, participar desta pesquisa e assim contribuir para realização desse estudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)	1
1.2. SINAIS E SINTOMAS DO TEA	3
1.3. PREVALÊNCIA	4
1.4. VITAMINA D	5
1.5. METABOLISMO DA VITAMINA D	7
1.6. RELAÇÃO ENTRE A VITAMINA D E TEA	10
2 - OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. DELINEAMENTO	17
3.2. POPULAÇÃO E AMOSTRA	17
3.2.1 Critérios de inclusão	17
3.2.2 Critérios de exclusão	18
3.2.3 Grupo controle	18
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	19
3.4. PROCEDIMENTOS.....	19
3.5. INSTRUMENTO DE PESQUISA.....	20
3.6. ASPECTOS ÉTICOS.....	20
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	23
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	35
ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	36
ANEXO 2: Formulário de coleta de dados.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo da vitamina D.....	10
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1: Distribuição da frequência quanto ao sexo e faixa etária	12
Tabela – 2: Média e mediana das idades	13
Tabela – 3: Valores séricos de vitamina D (ng/mL)	13
Tabela – 4: Valores de referência da vitamina D (ng/mL)	14

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sinais sugestivos de TEA no primeiro ano de vida	3
--	---

LISTA DE SIGLAS

TEA	Transtorno do Espectro Autista
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
UVB	Ultravioleta
GSH	Glutathiona
PTH	Paratormônio
DBP	Vitamin D Binding Protein
VDR	Vitamin D Receptor
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CARS	Childhood Autism rating Scale
ABC	Autism Behavior Checklist
CAPSi	Centro de Atendimento Psicossocial Infantil
TCLE	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
SRS	Escala de Resposta Social

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno comportamental e do desenvolvimento. A deficiência de vitamina D durante a gravidez ou na primeira infância foi proposta como um possível fator de risco ambiental para TEA.

Objetivo: Verificar os níveis séricos de Vitamina D em crianças com TEA.

Método: A amostra foi um total de 87 crianças (49 sujeitos com diagnóstico de TEA e 38 sujeitos para o grupo controle (GC)). Após realizada a coleta de sangue dos participantes da pesquisa foi realizada a dosagem de vitamina D em ambos os grupos e em seguida comparados os resultados. Foram realizadas medidas descritivas nos resultados da dosagem de Vitamina D e para comparação das duas amostras independentes foi utilizado o Teste de Mann-Whitney. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados: Das crianças estudadas, 80,5% foram do sexo masculino e 10,5% do sexo feminino; 83,9% tinham idades entre 3 e 11 e 16,1% entre 12 e 15 anos de idade; as crianças com o TEA apresentaram uma média de dosagem sérica de vitamina D de 29,94 ng/mL e o GC uma média de 34,86 ng/mL ($P < 0,05$). Apresentaram deficiência de vitamina D 18,37% do grupo experimental (GE) e 2,63 % do GC, insuficiência 28,57% do GE e 28,95% do GC e suficiência 53,06% do GE e 68,42% do GC.

Conclusão: pode haver uma associação entre baixos níveis de vitamina D e o Transtorno do Espectro Autista, mas ainda não está claro o motivo desse déficit no organismo, assim como, as consequências neurológicas que esse déficit proporciona. Novas pesquisas com um maior número de participantes, estudos moleculares, randomizados e duplo cegos poderão ser realizados para uma maior comprovação científica acerca desse tema.

Palavras-Chave: Transtorno do Espectro Autista; Vitamina D; Transtornos do Neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a behavioral and developmental disorder. Vitamin D deficiency during pregnancy or in infancy has been proposed as a possible environmental risk factor for ASD.

Objective: To verify the serum levels of Vitamin D in children with ASD.

Method: The sample was a total of 87 children (49 subjects diagnosed with ASD and 38 subjects for the control group (CG)). After taking the blood from the research participants, vitamin D was measured in both groups and then compared the results. Descriptive measurements were performed on the results of the dosage of Vitamin D and for comparison of the two independent samples, the Mann-Whitney test was used. A value of $P < 0,05$ was considered significant.

Results: Of the children studied, 80,5% were male and 10,5% were female; 83,9% were aged between 3 and 11 and 16,1% between 12 and 15 years of age; children with ASD had a mean serum vitamin D dose of 29,94 ng/mL and CG a mean of 34,86 ng/mL ($P < 0,05$). They presented vitamin D deficiency 18, 37% in the experimental group (EG) and 2, 63% in the CG, 28, 57% insufficiency in the EG and 28, 95% in the CG and sufficiency 53, 06% in the EG and 68, 42% of the GC.

Conclusion: there may be an association between low levels of vitamin D and Autistic Spectrum Disorder, but the reason for this deficit in the body is not clear, as well as the neurological consequences that this deficit provides. New research with a larger number of participants, molecular, randomized and double-blind studies can be carried out for greater scientific proof on this topic.

Key words: Autistic Spectrum Disorder; Vitamin D; Neurodevelopmental Disorders.

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno comportamental e do desenvolvimento caracterizado clinicamente por atrasos e diferenças qualitativas na comunicação e interação social, bem como, comportamentos repetitivos e interesses restritos, acompanhado por movimentos estereotipados, com níveis variados de gravidade. Trata-se de um transtorno permanente que ainda não possui cura, mas sabe-se que a intervenção precoce pode alterar o prognóstico e diminuir os sintomas (Comport, 2013; Feiyoung et al., 2015; SBP, 2019).

O diagnóstico mais abrangente de TEA surgiu a partir de uma junção de várias entidades clínicas com características autistas sob uma única denominação. O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-5) englobou todos os diagnósticos que no DSM-IV estavam sob uma extensa categoria de transtornos do desenvolvimento em um único transtorno denominado Transtorno do Espectro do Autista (Oberman & Kaufmann, 2020). Os critérios estabelecidos no DSM-5 identificam mais facilmente e apropriadamente as crianças mais novas e aquelas com sintomas leves. Isso é muito importante, pois quanto mais cedo se dá o diagnóstico mais rápida se inicia a intervenção precoce (Hyman et al., 2020).

O diagnóstico do TEA se concentrava principalmente em causas genéticas ou em anormalidades cerebrais intrínsecas, mas novos estudos têm focado no papel potencial de uma miríade de fatores bioquímicos e sistêmicos que podem ser extrínsecos ao cérebro, mas cujos efeitos secundários podem afetar o mesmo (Comport, 2013; Feiyoung et al., 2015; SBP, 2019).

A heterogeneidade do espectro autista já é bem conhecida, sendo o distúrbio comportamental e neurocognitivo sua principal característica. Atualmente o TEA é considerado um distúrbio com forte componente genético, no entanto, as diferenças em seu fenótipo levam a crer que a procura de uma causa exclusivamente genética seja provavelmente fadada ao insucesso, considerando que as diversidades de fenótipo estão também presentes em nível de genótipo (Hens, 2019).

Sendo assim, alterações genéticas não podem ser a única explicação para a eclosão do TEA. Outros fatores, também, podem influenciar o aparecimento do transtorno, como por exemplo, fatores ambientais. Embasado nessa hipótese, o entendimento atual de que existem, muito provavelmente, componentes epigenéticos em seu desenvolvimento, vem a desafiar a prévia visão predominante sobre o TEA como sendo um transtorno do neurodesenvolvimento com uma base puramente genética (Hens, 2019; Yu et al. 2020).

O crescente aumento de neurotoxinas no meio ambiente tem sido também apontado como uma das possíveis causas contributivas para a eclosão do TEA. Neurotoxinas presentemente permeiam o meio ambiente, seja na forma de resíduos industriais poluindo o solo, rios e oceanos e a atmosfera, ou sob a forma de aditivos em alimentos, adicionando-se a isso a presença de milhares de produtos químicos sintéticos em materiais utilizados no dia a dia (Kocovska, 2012).

Vários fatores ambientais podem vir a aumentar as chances de uma pessoa desenvolver o TEA, tais como: infecções durante a gestação e/ou no início da vida, complicações obstétricas, exposições a toxinas, deficiência de vitamina D no período gestacional, exposição à poluição do ar e uso de medicamentos psicotrópicos maternos durante a gravidez como, por exemplo, o uso de opióides (Vinkhuyzen, 2018; Rubenstein et al., 2019; Taylor et al., 2020). Um estudo realizado por Rubenstein et al. (2019) evidenciou que o uso de opióides durante a gravidez foi significativamente associado com maior probabilidade de ter um filho com características de TEA em comparação a crianças de mães que não usaram opióides durante a gestação.

Outro possível fator de risco é a idade avançada dos pais. Mutações incipientes na linha de células germinativas masculinas, devido à idade avançada, seriam uma possível explicação para a alta ocorrência de TEA nessas crianças (Frans et al., 2013).

Um crescente número de dados sugere que níveis diminuídos de vitamina D *in utero* ou durante a primeira infância pode ser um importante fator de risco para distúrbios do neurodesenvolvimento, como esquizofrenia e TEA (Vinkhuyzen, 2018; Yu, 2020).

O cérebro é um dos primeiros órgãos fetais a se desenvolver, e existem algumas evidências que sugerem que a vitamina D, devido ao seu papel biológico na

gênese do desenvolvimento do cérebro, pode afetar as funções cerebrais e influenciar o neurodesenvolvimento durante os primeiros anos de vida (Janbek et al, 2019).

Em extensa revisão sistemática Janbek et al. (2019) avaliaram a associação entre os níveis de vitamina D durante a gestação e o neurodesenvolvimento das crianças. Os autores chegaram à conclusão de que baixos níveis de vitamina D, já no segundo trimestre da gravidez, podem estar associados a resultados adversos no desenvolvimento da criança, mais especificamente nas áreas da linguagem e desenvolvimento motor, sendo que esta associação persistia até mesmo na adolescência.

A arquitetura genética do TEA é complexa, e seu exato mecanismo permanece indefinido. Muito provavelmente, o risco de TEA surge de mutações esporádicas no DNA (Jia, 2015). Essas mutações acontecem em genes que estão envolvidos na interação célula-célula e função sináptica, incluindo desenvolvimento de espinhas dendríticas, na migração e crescimento neuronal, e/ou nos neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Alguns estudos estão apontando essa ação da Vitamina D sobre os genes devido ao receptor da vitamina D (*Vitamin D Receptor VDR*), que se liga a locais específicos do genoma para influenciar a expressão dos genes. Pesquisa em animais demonstrou que a vitamina D desempenha um papel em todos esses processos cerebrais (Kocovská, 2012).

1.2. SINAIS E SINTOMAS DO TEA

Em algumas crianças os sinais e sintomas do TEA são percebidos logo após o nascimento. Na maioria dos casos, no entanto, esses sintomas só são identificados por volta dos 12 e 24 meses de vida e o diagnóstico só vem ser confirmado em média, aos 4 ou 5 anos de idade (SBP, 2019).

Os sintomas do TEA se manifestam como características comportamentais que se apresentam de forma diferente dependendo da idade, nível de linguagem e habilidades cognitivas. Os sintomas principais se agrupam em 2 domínios: comunicação / interação social e padrões repetitivos restritos de comportamento, conforme descrito no DSM- 5 (Hyman et al., 2020).

A heterogeneidade quanto as diferenças no fenótipo comportamental do TEA são bem documentadas, sugerindo que há muitas maneiras pelas quais uma realidade cognitiva ou biológica pode ser expressa. Para os psiquiatras e neurologistas infantis, diagnóstico de TEA nunca é apenas a descrição de características comportamentais de um indivíduo, e sim está relacionado aos desafios que o indivíduo experimenta em seu dia a dia (Hens, 2019).

Diante desses fatos, o diagnóstico do TEA é feito pela observação do comportamento e avaliação das disfunções, tendo como base o que é definido no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição (DSM-5). Alguns desses sinais estão apontados no Quadro 1.

Quadro 1 - Sinais sugestivos de TEA no primeiro ano de vida

Perda das habilidades já adquiridas, como: balbucio, gesto de alcançar objetos, contato Visual e/ou sorriso social
Não se voltar para sons, ruídos e vozes no ambiente
Não apresentar sorriso social
Baixo contato visual e deficiência no olhar sustentado
Demonstrar maior interesse por objetos do que por pessoas
Não acompanhar objetos e pessoas em movimento
Apresentar pouca ou nenhuma vocalização
Não aceitar o toque
Não responder ao nome
Imitação pobre
Baixa frequência de sorriso e reciprocidade social, bem como restrito engajamento social (pouca iniciativa e baixa disponibilidade de resposta)
Interesses não usuais, como fixação em estímulos sensório-viso-motores
Incômodo incomum com sons altos
Distúrbio de sono moderado ou grave
Irritabilidade e pouca responsividade no momento da amamentação

Fonte: Sociedade Brasileira de Pediatria (2019)

1.3. PREVALÊNCIA

A prevalência do TEA vem aumentando a cada ano. Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention (CDC), U.S*, em 2016, a prevalência do TEA foi de 18,5 por 1.000 crianças de 8 anos (1 em cada 54 crianças), e 4,3 vezes mais

prevalente entre meninos do que entre meninas (Maenner et al., 2020). Em 2014, a prevalência tinha sido de 1 a cada 59 crianças de 8 anos de idade (Baio et al., 2018).

Alguns questionamentos estão sendo levantados a respeito desse aumento do número de crianças como TEA, dentre eles, estão uma melhora na consciência diagnóstica, ampliação dos critérios diagnósticos e reclassificação diagnóstica (Compart, 2013).

Outra possibilidade é que os fatores ambientais associados ao TEA se tornaram mais comuns ao longo do tempo, contribuindo para um aumento na prevalência de TEA (Taylor et al., 2020).

1.4. VITAMINA D

A Vitamina D não é na verdade uma vitamina, mas um esteróide ativo, ou seja, um composto orgânico que desempenha um papel metabólico e hormonal. A principal fonte de vitamina D vem da conversão do 7-desidrocolesterol em pré-vitamina D3 na pele através da radiação ultravioleta solar. Uma quantidade menor de vitamina D provém de alimentos, principalmente a partir de laticínios fortificados e óleos de peixe (Sengenç et al., 2020; Christakos, 2010; Vinkhuyzen et al., 2018). Nos seres humanos, apenas 10% a 20% da vitamina D necessária à adequada função do organismo provém da dieta. Os restantes 80% a 90% são sintetizados endogenamente (Castro, 2011). A forma ativada da vitamina D, a 1,25-dihidroxitamina D3 (25 [OH] 2 D 3), é um esteróide com fortes efeitos endócrinos, parácrinos e autócrinos (Song et al., 2020).

A partir de estudos bioquímicos e moleculares, sua forma ativa, a 1 α ,25-diidroxi-vitamina D (1,25(OH)2D), foi reconhecida como um hormônio esteroide pertencente a um sistema metabólico: o sistema endocrinológico vitamina D (Castro, 2011).

A forma ativa da vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D) se liga ao receptor de vitamina D (VDR – Vitamin D receptor), que é membro de um grupo de receptores nucleares. Vários outros ligantes operando através de receptores nucleares são conhecidos por serem importantes no desenvolvimento do cérebro (por exemplo,

ácido retinóico, glicocorticoides, hormônio da tireoide e hormônios sexuais). Tanto o receptor de vitamina D quanto a enzima necessária para a produção de 1,25 dihidroxivitamina D, são expressos em neurônios e células gliais no cérebro (Vinkhuyzen et al., 2018).

A vitamina D normalmente entra na circulação após radiação UVB da luz do sol. Esta atinge o 7-deidrocolesterol na pele, convertendo através da energia térmica, para a vitamina D3 ou colecalciferol. Como todos os hormônios esteróides, o calcitriol atua como um interruptor molecular, ativando muitos genes-alvo por meio do Receptor de Vitamina D (VDR) (Cannell e Grant, 2013).

Uma série de avaliações epidemiológicas mostra que uma significativa parcela da população mundial, independentemente da idade, etnia e da localização geográfica, apresenta baixos níveis de vitamina D (Castro, 2011). A deficiência de vitamina D se tornou comum devido a um estilo de vida cada vez mais urbanizado e recomendações para evitar a exposição ao sol prolongadas desde a década de 1980 (Kocovská et al., 2012).

À vitamina D é primariamente atribuído o papel de importante regulador da fisiologia osteomineral, em especial do metabolismo do cálcio. Entretanto, a 1,25(OH)₂D está envolvida na homeostase de vários outros processos celulares, entre eles a síntese de antibióticos naturais pelas células de defesa dos mamíferos; modulação da autoimunidade e síntese de interleucinas inflamatórias; no controle da pressão arterial; e, como participa da regulação dos processos de multiplicação e diferenciação celular, é atribuído também a ela papel antioncogênico (Castro, 2011; Christakos et al., 2010). O baixo nível de vitamina D está associado a um risco aumentado de qualquer tipo de câncer e uma diminuição da taxa de sobrevivência, principalmente por causa de um aumento da gravidade dos sintomas e do potencial metastático de doenças malignas (Zmijewski, 2019).

Os níveis séricos de 25(OH) D considerados ideais para o organismo ainda são motivo de conflito na literatura médica. Geralmente, o status de vitamina D é classificado como deficiência, insuficiência, suficiência ou, em alguns casos, intoxicação (Janbek et al, 2019).

Alguns estudos consideram que o nível esperado de 25(OH)D seria aquele necessário para manter o paratormônio (PTH) em níveis adequados (o PTH é estimulado caso haja hipocalcemia causada pelos baixos níveis de calcitriol) e não

permitir o aparecimento de distúrbios clínicos e metabólicos relacionados à hipovitaminose D. Alguns estudos sugerem que o platô dos níveis de PTH e de absorção de cálcio são atingidos com valores de 25(OH)D próximos a 20 ng/mL, de forma que, segundo essa interpretação, os pontos de corte que melhor definem o estado de suficiência em 25(OH)D são: suficiência: > 20 ng/mL; insuficiência: 12 – 20 ng/mL; deficiência: 5 – 12 ng/mL; deficiência grave: < 5 ng/mL (Castro, 2011).

A diretriz da Sociedade de Endocrinologia dos Estados Unidos (*American Endocrine Society*) orienta a utilização dos seguintes critérios para interpretação do grau de suficiência em 25(OH) D: deficiência: < 20 ng/mL; insuficiência: 21 – 29 ng/mL; suficiência: 30 – 100 ng/mL (Castro, 2011).

Como a vitamina D facilita a absorção de cálcio e fosfato no intestino, impactando diretamente sobre a formação dos ossos e sua densidade, quando os níveis séricos de vitamina D estão inferiores a 20 ng / ml (50 nmol / L), a maioria da vitamina D ingerida ou derivada do sol é imediatamente desviado para as necessidades metabólicas, ou seja, a formação óssea, não deixando nada para suas funções superiores dentro do cérebro, sistema imunológico ou regulação gênica (Kocovská, 2012).

1.5. METABOLISMO DA VITAMINA D

A vitamina D passa por duas etapas metabólicas para alcançar a forma ativa, 1,25 (OH) 2D. A primeira etapa metabólica ocorre no fígado mediada principalmente pela enzima CYP2R1 e também por CYP27A1 para produzir 25 (OH) D, que é o principal circulante metabólito da vitamina D. A segunda etapa metabólica ocorre nos rins pela enzima CYP27B1 para gerar 1,25 (OH) 2D (Yu et al., 2020).

A etapa inicial no processo de síntese endógena das moléculas do grupo vitamina D se inicia nas camadas profundas da epiderme onde está armazenada a substância precursora, o 7-deidrocolesterol (7-DHC) e para que esse processo de ativação da vitamina D se inicie é preciso que o indivíduo receba a luz solar direta, especificamente a radiação ultravioleta B (type B ultravioleta - UVB) nos comprimentos

de onda entre 290 e 315 nanômetros (Castro, 2011; Christakos et al., 2010; Bikle, 2014).

A vitamina D é armazenada no organismo dependendo do tamanho da área exposta da superfície da pele e o tempo de exposição. Quando pessoas de pele clara tomam sol no verão elas produzem mais de 20.000 UI de vitamina D em menos de 30 minutos (Cannell e Grant, 2013).

A quantidade de raios UVB que atinge a pele dos indivíduos é um fator que influencia nessa etapa inicial do processo de síntese endógena das moléculas do grupo vitamina D. Os raios que atingem a pele é uma função inversa da latitude e é menor nos meses de inverno. Outro fator que influencia é a quantidade de melanina na pele do indivíduo (indivíduos com pele mais escura precisam de mais tempo de exposição ao sol para sintetizarem a vitamina D3). A melanina na pele bloqueia UVB de atingir 7-DHC, limitando assim, a produção da vitamina D3, assim como roupas e protetor solar. A absorção do fóton UVB pelo 7-DHC forma uma molécula secosteroide, a pré-vitamina D3, que após uma reação induzida pelo calor, assume uma configuração mais estável, a vitamina D3 (ou colecalciferol). Após essa etapa, a vitamina D3 ganha a circulação sanguínea (Castro, 2011; Bikle, 2014).

Por causa do termo vitamina, pensa-se erroneamente que a vitamina D é como outras vitaminas que podem ser obtidas em quantidades adequadas em uma boa dieta alimentar. No entanto, as dietas que a maioria dos humanos consomem contêm pouca vitamina D (Cannell e Grant, 2013). O colecalciferol, quando obtido pela dieta, provém de alimentos de origem animal, principalmente peixes gordurosos de água fria e profunda, como o salmão e o atum. Uma outra fonte dietética de vitamina D é o ergosterol (vitamina D2), proveniente de alimentos vegetais, em especial fungos (Castro, 2011). Alguns alimentos como leite, suco de laranja e cereais nos EUA, e margarinas na Europa, contêm pequenas quantidades de vitamina D, mas tais fontes são geralmente contribuintes menores para as reservas de vitamina D (Cannell e Grant, 2013).

O colecalciferol (D3) e o ergosterol (D2) são transportados no sangue por uma glicoproteína, a proteína chamada *Vitamin D Binding Protein* (DBP). Ao alcançarem o fígado, as vitaminas D2 e D3 sofrem hidroxilação dando origem a 25-hidroxivitamina D ou calcidiol (25(OH)D3 e 25(OH)D2). A 25(OH)D, acoplada à DBP, é transportada

a vários tecidos formando a 1- α ,25-dihidroxi-vitamina D [1,25(OH)₂D ou calcitriol], que é a molécula metabolicamente ativa (Castro, 2011; Christakos et al., 2010).

Figura 1: Metabolismo da Vitamina D

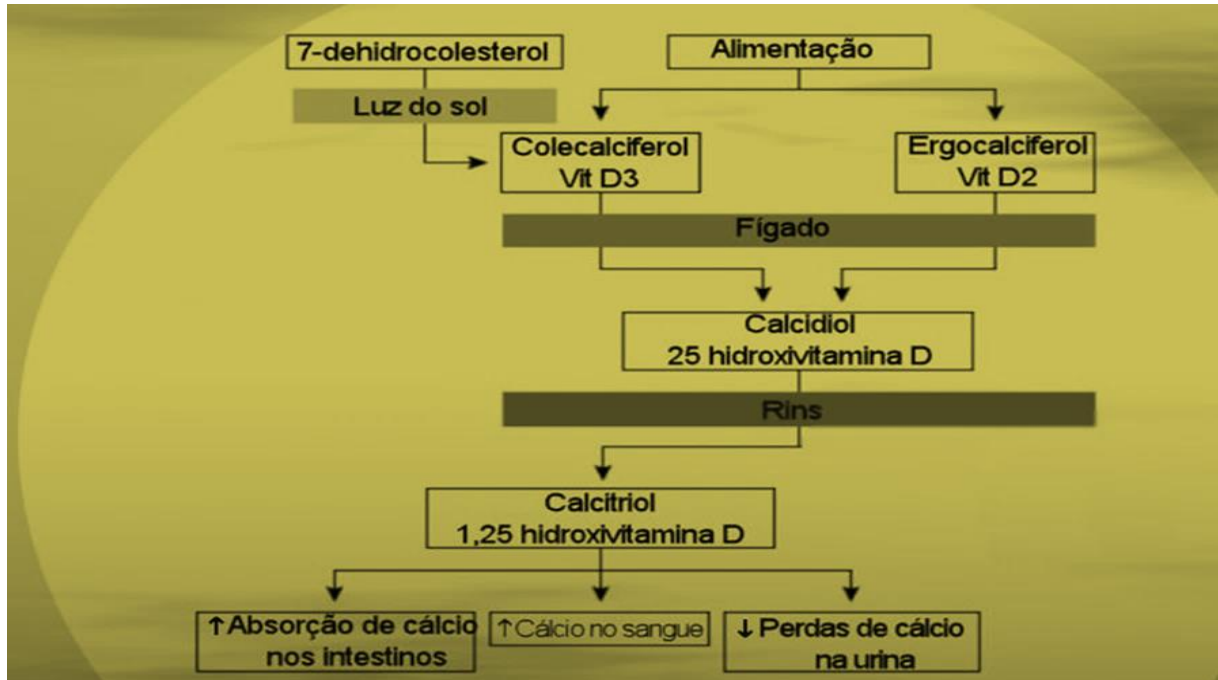


Figura 1: Metabolismo da vitamina D. Fonte: <https://www.mdsaude.com/nutricao/vitamina-d/>

Os efeitos biológicos da 1,25(OH)₂D são mediados pelo seu receptor VDR. Ele está presente em quase todas as células humanas e parece participar, de maneira direta ou indireta, da regulação de cerca de 3% do genoma humano. Entre as poucas células que não apresentam receptores para vitamina D, estão as hemácias, células musculares estriadas maduras e algumas células altamente diferenciadas do sistema nervoso central, como as células de Purkinje e os neurônios do setor CH4 do prosencéfalo basal (Castro, 2011).

A 1,25 (OH)₂D liga-se à porção hidrofóbica do VDR induzindo uma mudança conformacional e formação do complexo transcricional hormônio-receptor. Esse complexo hormônio-receptor acopla-se a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos, denominada VDRE (Castro, 2011).

A ação clássica da 1,25(OH)₂D é a regulação do metabolismo do cálcio e fósforo por meio do controle dos processos de absorção intestinal e reabsorção renal desses íons, mantendo-os em concentrações plasmáticas suficientes para assegurar a adequada mineralização e o crescimento ósseo em crianças e adolescentes e a

saúde óssea global em todas as etapas da vida. Entretanto, a quase universal distribuição do VDR nas células do organismo humano e a presença da CYP27B1 em vários tipos celulares mostram que a 1,25(OH)₂D está envolvida em uma ampla gama de funções envolvendo a homeostase sistêmica. A CYP27B1 é uma proteína responsável pela formação da 1- α ,25-diidroxi-vitamina D [1,25(OH)₂D ou calcitriol], que é a molécula metabolicamente ativa (Castro, 2011).

Os níveis da enzima necessários para a hidroxilação final são controlados pelo hormônio da paratireóide, cuja secreção é, por sua vez, desencadeada por baixas concentrações de cálcio ou fosfato (Kocovska, 2012). A hipocalcemia decorrente da hipovitaminose D estimula a síntese de paratormônio (PTH), o qual estimula a expressão da 1- α -hidroxilase, consumindo e convertendo a 25(OH)D em 1,25(OH)₂D (Castro, 2011).

1.6. RELAÇÃO ENTRE A VITAMINA D E O TEA

Um potencial fator de risco ambiental que está sendo apontado como uma possível causa para o TEA é a deficiência de vitamina D. Essa deficiência afeta cerca de 1 bilhão de pessoas. Embora a deficiência de vitamina D prejudique a saúde óssea, relatórios recentes sugerem implicações neurológicas, imunológicas e doenças inflamatórias devido ao seu papel único na homeostase cerebral, neurodesenvolvimento e regulação gênica (Kerley et al., 2017).

A vitamina D pode desempenhar um importante papel na etiologia do TEA, influenciando a expressão de genes relacionados ao autismo. Estudos sugerem que a disponibilidade e o metabolismo da vitamina D podem ter efeitos notáveis na saúde mental das pessoas. Os mecanismos desses efeitos não são totalmente compreendidos, mas estudos em animais mostraram que o baixo nível de vitamina D3 na fase pré-natal pode contribuir para um desenvolvimento anormal do cérebro, caracterizado pelo aumento do seu tamanho e dos ventrículos, além de distorção na forma do cérebro (Cannell e Grant, 2013).

O sistema hormonal da vitamina D inclui mais do que a clássica preservação da quantidade de cálcio no organismo. A enzima citocromo P450, que hidroxila 25

(OH) D em calcitriol, está presente em uma ampla variedade de tecidos humanos. Desse modo, a função hormonal da vitamina D afeta diretamente muitas células e tecidos por meio de suas funções autócrinas e presumivelmente parácrinas. A maioria dos órgãos do corpo mostra evidências de responsividade ao calcitriol, incluindo várias áreas do cérebro (Azzam et al., 2015). Polimorfismos genéticos em enzimas relacionadas ao metabolismo da vitamina D estão associados ao risco de TEA e a gravidade da doença (Yu et al., 2020).

Em um estudo, após uma suplementação de vitamina D durante 6 meses, foi avaliado o efeito desta sobre os sintomas do TEA em 21 crianças. O grupo experimental recebeu uma dose diária de vitamina D3 (2.000 UI). Todos os pacientes foram mantidos em terapia comportamental e fonoaudiológica por 30 minutos, três vezes por semana. O suplemento de vitamina D foi bem tolerado e os níveis de 25-hidroxi-vitamina D melhorou no grupo suplementado, porém ambos os grupos suplementados e não suplementados mostraram melhora nos sintomas do TEA, sem diferença estatisticamente significativa. Esse resultado se deu provavelmente pela baixa dosagem de suplementação de vitamina D no grupo experimental (Azzam et al., 2015).

A associação entre autismo e os níveis de vitamina D vem sendo cada vez mais investigada. Numerosos trabalhos têm apontado possível ligação entre níveis deficientes de calcitriol [1,25 (OH) 2D₃] e a presença e grau de severidade do TEA.

Meguid e Hashish (2010) conduziram um estudo compreendendo 70 crianças com TEA e 42 controles saudáveis no Cairo/Egito com idade entre 2 e 8 anos. O grupo TEA tinha níveis significativamente mais baixos de 25 (OH) D (28,5 ng/ml) em comparação com os controles sem o TEA (40,1 ng / ml; P <0,001). Por causa do clima ensolarado no Egito, um nível médio de 28,5 ng/ml foi considerado inadequado.

Mostafa e Al-Ayadhi (2012) mediram os níveis de 25 (OH) D em 50 crianças com 5 a 12 anos de idade, portadoras de TEA e 30 crianças sem o TEA da mesma idade na Arábia Saudita. Crianças com o TEA apresentaram níveis séricos de vitamina D significativamente mais baixos (18,5 ± 14 ng/ml) do que as crianças sem o TEA (33,0 ± 11 ng/ml; P <0,001). Adicionalmente, 40% das crianças com TEA apresentaram concentrações de vitamina D abaixo de 10 ng/ml, sendo que nenhuma das crianças do grupo controle apresentou níveis de vitamina D tão baixos. Outro dado dessa pesquisa evidenciou que 48% das crianças com TEA e apenas 20% dos

controles tinham níveis de vitamina D entre 10 e 30 ng/ml, sugerindo que a deficiência de vitamina D pode ser um sério fator de risco para o TEA. Este estudo também demonstrou que os níveis séricos de 25 (OH)D foram, de forma significativa ($P < 0,001$), negativamente correlacionado com pontuações na escala de avaliação do autismo da criança (CARS – Childhood Autism Rating Scale), o que implicava uma possível ligação entre o nível de deficiência de vitamina D e a gravidade dos sintomas do autismo.

Em estudo realizado em Juiz de Fora/ Minas Gerais foram selecionadas 24 crianças diagnosticadas com o TEA e 24 controles sem o TEA de acordo com a idade e o sexo. Os pesquisadores avaliaram os níveis de 25-hidroxivitamina D (25-OHD) nesses dois grupos. Os níveis séricos de 25-OHD foram significativamente menores em crianças com TEA (26,48 vs 40,52 ng/ml) quando comparado com crianças com desenvolvimento típico (Tostes et al., 2012).

Gong et al. (2014) relataram os níveis séricos de 25 (OH) D em 48 crianças com TEA e 48 controles sem o TEA, de idade e sexo equivalentes, em Chongqing/ China. O nível sérico médio de 25 (OH)D encontrado foi significativamente ($P = 0,002$) menor em crianças com TEA em comparação com os controles (19,9 vs 22,6 ng/ml). Também neste estudo o CARS foi usado para avaliar a severidade dos sintomas de TEA. Níveis reduzidos de vitamina D foram significativamente correlacionados com a gravidade dos sintomas do TEA ($P < 0,001$). Os autores concluíram que baixos níveis de vitamina D podem ser associados com a gravidade do TEA, e que níveis séricos mais baixos de 25 (OH)D podem ser considerados um fator de risco para a presença e gravidade do TEA.

Em outro interessante estudo (Kocovska et al., 2014), efetuado nas longínquas Ilhas Faroé (território autônomo incluído no Reino da Dinamarca), que apresentam uma baixa exposição anual ao sol devido à sua alta latitude (latitude 61,41 graus N), os autores compararam os níveis de 25 (OH)D em adultos jovens com TEA (com idades compreendidas entre 15 e 24 anos) com seus irmãos com desenvolvimento típico, com seus pais e com controles saudáveis (pareados por idade e sexo). O grupo TEA evidenciou níveis de vitamina D significativamente mais baixos (24,8 nmol/l) quando comparados com o grupo de irmãos (46,1 nmol/l - $P < 0,001$), com o grupo de pais (46,7 nmol/l, $P < 0,001$) e com o grupo controle (37,6 nmol/l, $P = 0,002$). Nenhuma associação foi encontrada entre o nível sérico de vitamina D e nível intelectual, grau

de severidade do TEA ou pontuações na Escala de Observação para o Diagnóstico de Autismo (Autism Diagnostic Observation Schedule - (ADOS)) que é outro instrumento eventualmente usado no diagnóstico do autismo.

Bener et al. (2014) testaram os níveis séricos de 25(OH)D em 254 crianças com TEA (idade média $5,51 \pm 1,58$ anos) e 254 controles saudáveis (idade média $5,76 \pm 1,56$ anos) no país árabe de Catar. O valor médio da vitamina D sérica em crianças com TEA ($18,39 \pm 8,2$ ng/ml) foi significativamente menor do que a detectada em crianças controle ($21,59 \pm 8,4$ ng / ml; $P < 0,05$). A porcentagem de crianças que tinha deficiência de vitamina D foi significativamente maior no grupo com TEA do que no grupo controle (14,2 vs 8,3% - $P < 0,01$).

Em estudo efetuado por Du et al. (2015), níveis séricos de 25 (OH)D foram estudados em 117 crianças com TEA e em 109 controles saudáveis, em Changchun/China. A concentração sérica de vitamina D no grupo controle (36 ± 13 ng/ml) foi significativamente maior do que a encontrada no grupo de crianças com TEA (19 ± 9 ng/ml, $P < 0,01$). A porcentagem de crianças tanto com insuficiência como de deficiência de vitamina D no grupo TEA foi significativamente maior do que no grupo controle (89,7 vs 52,3% - $P < 0,01$).

Em estudo adicional, proveniente de Assiut/ Egito, os pesquisadores avaliaram a relação entre a deficiência de vitamina D e a gravidade do autismo e os efeitos da suplementação de Vitamina D em crianças com TEA. Das 122 crianças com TEA (com idade compreendidas entre 3 e 9 anos), 106 apresentaram baixos níveis séricos de vitamina D (18.02 ± 8.75 ng/ml). Desses com níveis baixos de vitamina D, 83 receberam 300 IU / kg /dia, não excedendo 5000 UI/dia, por 3 meses. Dos indivíduos que receberam tratamento com vitamina D3, 80,72% (67/83), apresentaram significativa melhora no comportamento, na frequência de estereotípias, e no contato visual e atenção. Os autores concluíram que a vitamina D pode ter efeitos benéficos no TEA, especialmente quando nível sérico superior a 40 ng/ml for alcançado (Saad et al., 2016).

Em estudo realizado na Suécia, Fernell et al. (2015) analisaram os níveis de vitamina D em 58 pares de irmãos, sendo que um dos pares era portador de TEA e o outro não. As amostras de gotas de sangue em papel de filtro que tinham sido obtidas no período neonatal para triagem metabólica foram recuperadas e usadas para testar os níveis de 25(OH)D. A conclusão do estudo foi que crianças com TEA

apresentavam, no período neonatal ($P = 0,013$) níveis mais baixos de vitamina D ($24,0 \pm 19,6$ ng/ml) em comparação com seus irmãos ($31,9 \pm 27,7$ ng/ml).

Finalmente, Sengenç et al. (2020), eles avaliaram os níveis séricos de vitamina D em 1529 pacientes com TEA, de 3 a 18 anos de idade. A deficiência ou insuficiência de vitamina D foi encontrada em aproximadamente 95% de todos os pacientes comparados com o grupo controle. Dos pacientes com TEA 58% tinham deficiência de vitamina D e 13% tinham deficiência grave.

Apesar de todos os estudos acima relacionados concluírem haver uma correlação entre níveis baixos de vitamina D e a presença e o grau de severidade do TEA e, adicionalmente, que uma melhora da sintomatologia do TEA é observada quando da complementação dos pacientes com vitamina D, observa-se que nem todos os trabalhos apresentaram resultados positivos.

Resultados negativos foram obtidos por Molloy et al. (2010) nos Estados Unidos ao compararem os níveis séricos de 25(OH)D de 40 meninos caucasianos com TEA (com idades compreendidas entre 4 e 8 anos) com grupo de 40 controles. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois grupos ($P = 0,4$). Neste estudo, um total de 54 (61%) das crianças em toda a coorte (tanto pacientes como controles) apresentavam uma concentração sérica de vitamina D inferior a 20 ng/ml (sendo que 30 ng/ml é geralmente considerado como valor de corte entre níveis adequados e inadequados). Um grave viés deste estudo é que todas as crianças do grupo de controle estavam sofrendo de inflamação aguda, o que poderia potencialmente afetar os níveis de vitamina D plasmática.

Adams et al. (2011) avaliaram o estado nutricional e metabólico de 55 crianças com idades entre 5 e 16 anos, todas portadoras de TEA e de 44 crianças sem o TEA no estado do Arizona/ EUA. Estes autores não observaram diferenças significativas entre os dois grupos em relação aos níveis de vitamina D ($P =$ não significativo).

Resultados não significativos também foram obtidos por Uğur & Gürkan (2014) que avaliaram os níveis de 25(OH)D de 54 crianças (idades entre 3 e 8 anos) em Ancara/ Turquia, comparando-os com os de 54 controles (pareados por sexo e idade). Estes autores também não encontraram nenhuma diferença entre crianças com TEA ($25,12$ ng/ml) e os controles saudáveis ($21,11$ ng/ml, $P=0,069$). Além disso, eles não encontraram nenhuma correlação entre a gravidade dos sintomas de TEA (tanto usando avaliação pelo ABC como pela pontuação do CARS) e os níveis séricos de

vitamina D ($P > 0,05$). Neste estudo, tanto as crianças com TEA quanto controles saudáveis apresentaram um nível médio de vitamina D relativamente baixo (menor de 30 ng/ml). Os autores atribuíram possivelmente estes baixos níveis à alta latitude de Ancara com conseqüente diminuta exposição à luz solar.

É importante notar que algumas crianças com o TEA podem ter outras doenças que possivelmente afetam a absorção da vitamina D e a sua formação no corpo. Além disso, razões geográficas e hábitos de vida associados à exposição insuficiente a luz solar pode prejudicar a absorção da vitamina D tanto em portadores de TEA como em crianças não afetadas (Song et al., 2020).

Baixos níveis de vitamina D podem estar implicados na fisiopatologia do TEA de várias maneiras. Existe uma hipótese de que o TEA é uma combinação de anormalidades fisiológicas e sistemáticas específicas de órgãos, como mutações genéticas, estresse oxidativo, inflamação, sistema imunológico desregulado, alterações de neurotransmissores e convulsões. Apesar das crescentes evidências sugerindo que baixos níveis de vitamina D estariam envolvidos na etiologia das anormalidades acima mencionadas, dúvidas e controvérsias ainda existem (Mazahery, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Verificar os níveis séricos de Vitamina D em crianças com Transtorno do Espectro Autista.

2.2. ESPECÍFICO

Comparar os níveis séricos de Vitamina D de crianças com o TEA com o de crianças sem evidências do TEA, sem diagnóstico de afecção neurológica e/ou psiquiátrico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Estudo observacional, analítico e transversal realizado no Centro de Atenção Psicossocial Infantil (CAPSi) do Recanto das Emas/ DF.

3.2. POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população foi composta por crianças e adolescentes com diagnóstico médico de TEA. A amostra foi de conveniência, de acordo com as sucessivas admissões no CAPSi e dependente de anuência dos pais em tomar parte na pesquisa. Um total de 87 crianças (49 sujeitos crianças com diagnóstico de TEA e 38 crianças sujeitos sem nenhum diagnóstico de distúrbio neurológico e/ou psiquiátrico, para o grupo controle.

O cálculo na amostra foi determinado pela fórmula estatística $n = Z^2 \cdot p \cdot (100-p)/E^2$. Onde n é o tamanho da amostra, Z uma constante que está relacionada com o nível de confiança do estudo, E o desvio padrão (margem de erro) e p a porcentagem esperada de autismo na população. A porcentagem p de autistas na população geral varia de 1 a 3% (CDC, 2019), para efeito de cálculo foi considerado 3%, a constante Z é 1,96, dado fornecido por uma tabela estatística com o grau de confiança de 95% e a margem de erro E admitida nesta pesquisa foi de 5%. Sendo assim, uma amostra com um n de 45 crianças com o diagnóstico de autismo já seria estatisticamente adequado para esta pesquisa. Utilizamos um n de 49 crianças com diagnóstico de TEA.

3.2.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão no presente estudo são crianças com o diagnóstico de TEA grave, em acompanhamento no Centro de Atenção Psicossocial infantil (CAPSi) do Recanto das Emas, com idades compreendidas entre 2 e 15 anos.

O CAPSi é um serviço de referência no acompanhamento de crianças com distúrbios mentais. As crianças normalmente são oriundas de unidades da rede de saúde da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal e já tendo tido o diagnóstico estabelecido por profissionais médicos especializados (Psiquiatra infantil ou Neuropediatra), podendo ser oriundas tanto da rede pública quanto da rede privada. O diagnóstico pode ser efetuado por profissionais externos ao serviço e posteriormente confirmado pelos profissionais do CAPSi, com base nos critérios da 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-5). Todas as crianças selecionadas tinham sido diagnosticadas como portadoras de TEA grave, conforme classificação da Childhood Autism Rating Scale (CARS) (Chlebowski et al., 2010), que é uma das escalas mais utilizadas para classificação do grau de comprometimento do TEA.

3.2.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão compreenderam: crianças com TEA de alto funcionamento (Asperger), crianças com comorbidades como Síndrome de Down ou Síndrome de Rett ou crianças que estivessem em uso de medicações que poderia influenciar o resultado do teste ELISA para aferição da concentração de vitamina D (como, por exemplo, complexos vitamínicos).

3.2.3 Grupo Controle

As crianças selecionadas para este estudo foram divididas em dois grupos. O grupo de crianças portadoras de TEA e o grupo controle.

O grupo controle foi composto por crianças com paridade etária com o grupo analisado, que não tivessem nenhuma patologia de base e não estivessem em uso de complementação vitamínica e que estivessem sendo acompanhadas pelo serviço de pediatria da Clínica da Família 1 do Recanto das Emas (Brasília-DF).

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas medidas descritivas nos resultados da dosagem de vitamina D, como média, mediana e desvio padrão e para comparação das duas amostras independentes foi utilizado um teste não paramétrico, o Teste de Mann-whitney. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo para essas análises. Para processar e analisar os dados foi utilizado o SPSS versão 21.0.

3.4. PROCEDIMENTOS

Após explanação detalhada da pesquisa para o responsável/cuidador da criança foi entregue o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1) e após a assinatura deste foram coletados dados demográficos da criança/adolescente referente a idade, sexo e uso de medicações. Em seguida foi realizada uma coleta única de sangue venoso. O sangue foi armazenado em caixa de isopor com gelox e transportado até o Laboratório Interdisciplinar de Biociências Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), onde foi centrifugado a $1.000 \times G$ por 15 minutos, aliquotado e armazenado a $-30^{\circ} C$ até ser realizada a dosagem da vitamina D.

As crianças estavam em jejum e foi realizada uma única coleta de sangue logo cedo pela manhã. A coleta ocorreu no laboratório da Clínica da Família 1 do Recanto das Emas que fica em frente ao CAPSi do Recanto das Emas.

As dosagens de vitamina D foram realizadas por uma Biomédica pelo método de ELISA, utilizando kit comercial (vitamina D 25-OH da Euroimmun Brasil, São

Caetano do Sul, SP). Esse kit ELISA foi desenvolvido para a determinação *in vitro* de vitamina D 25-OH no soro ou plasma humano. Na primeira fase de análise, os calibradores e as amostras do paciente foram diluídos com biotina marcada com vitamina D 25-OH e adicionado aos poços de microplacas revestidas com anticorpo monoclonal anti-vitamina D 25-OH. Durante a incubação uma quantidade desconhecida de vitamina D 25-OH na amostra do paciente e uma quantidade conhecida de biotina marcada com vitamina D 25-OH competiram pelos locais de ligação do anticorpo na microplaca. A vitamina D 25-OH não ligada é removida por lavagem. Para a detecção da vitamina D 25-OH, marcada com biotina, uma segunda incubação foi realizada usando a estreptavidina marcada com peroxidase. Numa terceira incubação usando peroxidase e o substrato tetrametilbenzidina (TMB), a peroxidase ligada promoveu uma reação de cor. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de vitamina D 25-OH na amostra (Teste ELISA - vitamina D 25-OH, 2016).

3.5. INSTRUMENTO DE PESQUISA

Foi utilizado um formulário estruturado para o levantamento dos dados sócio demográficos e dados referentes ao uso de medicações (ANEXO 2).

3.6. ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedeceram aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados ofereceu riscos à dignidade dos sujeitos da pesquisa. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (CEP/FEPECS) sendo aprovado através do protocolo 3.253.126.

4. RESULTADOS

A amostra total foi de 87 pessoas moradoras do Distrito Federal ou de cidades do entorno, sendo 49 com diagnóstico médico de TEA grave e 38 sem nenhuma doença psíquica ou neurológica.

Tanto no grupo de TEA como no grupo controle houve predomínio do sexo masculino e a maioria dos participantes desta pesquisa tem idades entre 3 e 11 anos (Tabela 1).

Tabela – 1: Distribuição da frequência quanto ao sexo e faixa etária

		TEA	Controle	Total
		n (%)	n (%)	n (%)
Sexo	Masculino	44 (89,8)	26 (68,4)	70 (80,5)
	Feminino	5 (10,2)	12 (31,6)	17 (10,5)
Faixa etária (anos)	3 – 11	43 (87,8)	30 (79)	73 (83,9)
	12 – 15	6 (12,2)	8 (21)	14 (16,1)

A média e a mediana das idades de ambos os grupos apresentaram valores semelhantes. A idade mínima de ambos os grupos foi de 2 anos e a máxima de 15 anos (Tabela 2).

Tabela – 2: Média e mediana das idades

Grupo	Média	Mediana	DP
TEA	6,73	6	3,32
Grupo controle	8,5	8	3,32

O nível médio dos valores séricos de vitamina D no grupo de pessoas com TEA ($29,94 \pm 9,47$) foi de forma significativa ($p < 0,05$) menor que os do grupo controle ($34,86 \pm 9,47$) neste presente estudo. O menor valor de concentração sérica encontrado no grupo experimental foi de 11,95 e no grupo controle foi de 18,31. E o

maior valor de concentração sérica encontrado no grupo experimental foi de 55,45 e no grupo controle foi de 55,88 (Tabela 3).

Tabela – 3: Valores séricos de vitamina D (ng/mL)

Grupo	n	Menor	Maior	Mediana	Média	DP	p valor
TEA	49	11,95	55,45	30,54	29,94	9,47	0,045
Grupo controle	38	18,31	55,88	32,49	34,86	9,47	

* Teste Mann-Whitney

Quanto aos valores de referência houve maior deficiência e insuficiência de vitamina D no grupo de crianças com o TEA (Tabela 4).

Tabela – 4: Valores de referência da vitamina D (ng/mL)*

Valores da Vitamina D ng/mL	TEA n (%)	Grupo Controle n (%)
Deficiência (< 20)	9 (18,37)	1 (2,63)
Insuficiência (21 – 29)	14 (28,57)	11 (28,95)
Suficiência (30 – 100)	26 (53,06)	26 (68,42)
Total	49 (100)	38 (100)

*Os valores de referência usados para esta pesquisa foram os mesmos do Kit Elisa utilizado para analisar as dosagens de vitamina D desta pesquisa.

5. DISCUSSÃO

Esse estudo observacional, analítico e transversal comparou os níveis séricos de Vitamina D de crianças com o TEA com o de crianças sem evidências do TEA. A população de crianças com TEA apresentou um valor significativamente menor na dosagem sérica de Vitamina D, comparando-se com o grupo controle. Alguns trabalhos corroboram com este resultado encontrado nesta pesquisa (Mostafa e AL-Ayadhi, 2012; Tostes et al., 2012; Arastoo et al., 2018; Saad et al., 2018).

A maioria das crianças foi do sexo masculino. Dado também encontrado no último levantamento realizado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Maenner et al., 2020).

O nível médio dos valores séricos de vitamina D no grupo de pessoas com TEA ($29,94 \pm 9,47$) foi de forma significativa menor que os do grupo controle ($34,86 \pm 9,47$). Um valor de 18,37% das crianças com o TEA apresentou níveis séricos deficientes de Vitamina D (< 20 ng/mL) e 28,57% apresentaram níveis insuficientes (21-29 ng/mL). Esse resultado demonstra que 46,94%, quase metade da amostra, apresentou níveis séricos de vitamina D abaixo do que foi considerado adequado para esta pesquisa. Mostafa e AL-Ayadhi (2012), Tostes et al. (2012), Arastoo et al. (2018) e Saad et al. (2018) também encontraram resultados semelhantes em suas pesquisas, como relatado abaixo. Os valores de corte utilizado para esta pesquisa foram os indicados pelo teste Elisa utilizado, mas ainda não se tem um consenso sobre qual a dosagem ideal de vitamina D para que ela seja considerada benéfica para o organismo.

Arstoo et al., (2018) utilizaram como parâmetros de mensuração da 25-hidroxivitamina D valores menores ou iguais a 20 ng/mL como deficientes, entre 21-29 ng/mL, insuficiente e de 30 ng/mL ou mais como níveis normais. No grupo das crianças com TEA, todas apresentaram deficiência ou nível insuficiente de 25-hidroxivitamina D sérica.

Mostafa e AL-Ayadhi (2012) fizeram um estudo com 80 crianças (50 com o TEA e 30 como grupo controle). Eles avaliaram os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D nos dois grupos. O resultado encontrado foi níveis séricos significativamente mais baixos de 25-hidroxivitamina D nas crianças com TEA comparadas ao grupo controle.

Tostes et al. (2012) também investigaram uma associação entre os níveis séricos de vitamina D em crianças com o TEA. Os níveis séricos de 25-OHD foram menores em crianças com o TEA em comparação com crianças com desenvolvimento típico.

O Transtorno do Espectro Autista é um distúrbio neurobiológico influenciado por fatores genéticos e ambientais que afetam o desenvolvimento do cérebro. Ainda não se sabe o real mecanismo etiológico, pois os estudos neuropatológicos são limitados, mas revelaram diferenças na arquitetura cerebelar e conectividade, assim como, anormalidades do sistema límbico, lobo frontal e temporal, alterações corticais, junto com outras malformações sutis (Hodges et al., 2020). Concentrações mais baixas de vitamina D3 podem levar ao aumento do tamanho do cérebro, formato do cérebro alterado e ventrículos aumentados, que foram observados em pacientes com TEA (Jia, 2015).

Embora a etiologia do autismo não seja totalmente compreendida, já se sabe que existe uma predisposição genética, que pode ser desencadeada por fatores nutricionais e/ou ambientais, como infecções, problemas imunológicos, produtos químicos que alteram o sistema endócrino, intoxicação por metais pesados, síndrome alcoólica fetal e deficiência de vitamina D (Sengenç et al., 2020).

Estudos de coorte de nascimento forneceram evidências de que a deficiência de vitamina D gestacional está associada a prejuízos cognitivos relacionados à linguagem, desenvolvimento motor e inteligência geral (Vinkhuyzen, 2018).

É crescente a quantidade de estudos que abordam as possíveis causas e o melhor tratamento dos sinais e sintomas do TEA. Dentre as causas que potencialmente podem contribuir para o agravamento do quadro de TEA encontra-se os baixos níveis séricos de Vitamina D. Acredita-se que há uma relação entre baixos níveis séricos de Vitamina D e alterações no neurodesenvolvimento em pessoas com o TEA (Vinkhuyzen, 2018; Tostes et al., 2012; Mostafa, AL-Ayadhi, 2012; Vinkhuyzen, 2018; Jia, 2015; Sengenç et al., 2020).

Em uma meta-análise de ensaios clínicos randomizados, Song et al. (2020), chegaram à conclusão de que a suplementação de vitamina D é um fator protetor em crianças com TEA, apesar de sua meta-análise ter sido limitada e prejudicada pelo baixo número e nível de ensaios clínicos existentes.

Em outro estudo, um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, 109 crianças com TEA foram avaliadas quanto aos efeitos da suplementação de vitamina D nos sintomas do TEA. A gravidade do TEA e a maturidade social das crianças foram avaliadas antes e depois da suplementação e houve melhora significativa dos sintomas no grupo experimental e não no grupo placebo (Saad et al., 2018).

Em um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, 38 crianças realizaram suplementação de vitamina D (2.000 UI diariamente) por 20 semanas. Foram avaliadas antes e depois da intervenção. Os pesquisadores não encontraram diferenças significativas entre os grupos nas escalas de avaliação do comportamento. Houve, apenas, aumento da dosagem sérica de vitamina D no grupo suplementado. Isso pode ter acontecido tanto pela má absorção da vitamina D como pela baixa dosagem diária que foi ofertado ao grupo experimental (Kerley et al., 2017).

Vários ensaios clínicos também mostraram efeitos positivos da suplementação de vitamina D na saúde de humanos em geral, e sugeriu sua possível utilização no tratamento de diversas doenças, incluindo câncer. Contudo, ainda são necessários grandes estudos para validar os benefícios potenciais e a segurança da vitamina D (Zmijewski, 2019).

É crescente na literatura que maiores concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D], seja na gestação ou no início da vida, pode reduzir o risco de TEA (Cannell, 2013), pois a deficiência de vitamina D pré-natal ou alterações em seu metabolismo podem alterar o desenvolvimento neurológico devido a mesma desempenhar um papel no crescimento neuronal e na regulação da proliferação celular no cérebro em desenvolvimento. Este papel é confirmado pela detecção de calcitriol e seus receptores em uma variedade de tecidos cerebrais desde a embriogênese (Kocovska, 2012).

A vitamina D se liga a mais de 2.700 genes e regula a expressão de mais de 200 desses genes. Ela é necessária para regular a produção de serotonina, além de aumentar os níveis de estrogênio na placenta e no cérebro. Isso poderia explicar o porquê de o sexo masculino ter um risco quatro a cinco vezes maior de TEA do que mulheres (Song et al., 2020). Assim, se os indivíduos carregam fatores etiológicos que aumentam sua vulnerabilidade ao TEA, a deficiência de vitamina D pode tender a colocar esses indivíduos em maior risco cerebral embrionário, fetal e infantil (Azzam et al., 2015).

Segundo o DSM-5, o TEA está classificado dentro dos transtornos do neurodesenvolvimento, caracterizado por déficits persistentes na comunicação social e na interação social e em habilidades para desenvolver, manter e compreender relacionamentos. A vitamina D pode reduzir esses sintomas do autismo por meio de suas ações anti-inflamatórias, aumentando as células T regulatórias e efeitos anti-autoimunes e regulação positiva da glutatona, um eliminador de subprodutos oxidativos, contribuindo assim para uma diminuição do risco de TEA (Jia, 2015).

Distúrbios imunológicos, principalmente reações autoimunes ao tecido nervoso, pode ter um papel patogênico no TEA. A deficiência de vitamina D foi apontada como uma dessas alterações imunológicas. Os receptores da vitamina D e as enzimas que metabolizam a vitamina D estão presentes no SNC, isso pode ser um potencial fator ambiental desencadeador de algumas doenças autoimunes (Mostafa, AL-Ayadhi, 2012).

Uma variedade de diferenças no sistema imunológico foi documentada em indivíduos com TEA, como quantidade de citocinas aumentadas no sangue, aumento de citocinas pró-inflamatórias; baixa atividade de células natural killer e níveis de imunoglobulina anormal (Compart, 2013). Mostafa e AL-Ayadhi (2012), em seu estudo, verificaram que os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D tiveram correlações negativas com os níveis séricos de autoanticorpos anti-MAG (indicadores de autoimunidade para tecido cerebral). Níveis elevados de anticorpos anti-MAG foram encontrados em 70% dos pacientes com o TEA e a deficiência de vitamina D foi encontrada na maioria das crianças com TEA. Essa deficiência de vitamina D pode contribuir para a indução da produção de autoanticorpos anti-MAG séricos nessas crianças.

A vitamina D pode auxiliar na manutenção da homeostase do cérebro, protegendo o DNA de um estresse oxidativo. Ela tem papel importante na proliferação e diferenciação, sinalização de cálcio e ações neurotróficas e neuroprotetoras no cérebro, e também pode alterar a neurotransmissão e a plasticidade sináptica. Muitos estudos epidemiológicos relataram que a deficiência de vitamina D está associada a uma ampla gama de transtornos neuropsiquiátricos e doenças neurodegenerativas (Sengenç et al., 2020).

Tendo em vista a presença de vitamina D, suas enzimas ativadoras e receptores de vitamina D (VDR) no cérebro, ela pode também ser classificada como

um neuroesteróide. Além disso, a presença de altos níveis de VDR no cérebro em desenvolvimento desde os estágios iniciais e seus aumentos com a idade gestacional, sugere um papel para a vitamina D no neurodesenvolvimento (Kocovska, 2012).

A deficiência de vitamina D está frequentemente associada a várias doenças neurológicas devido a seu receptor VDR se encontrar em várias estruturas cerebrais, incluindo no hipocampo, hipotálamo, substância negra e tálamo. A vitamina D regula a expressão de neurotrofinas, incluindo fator de crescimento neural (NGF) e neurotransmissores (acetilcolina, dopamina e ácido gama-aminobutírico). Ela é importante na prevenção e tratamento de distúrbios neurológicos, com foco na esclerose múltipla, acidente vascular cerebral e doenças de Alzheimer e Parkinson (Zmijewski, 2019).

Em um estudo de coorte prospectivo em uma população multiétnica realizado com 4229 mulheres grávidas e seus filhos até 6 anos de idade, objetivaram identificar correlatos ambientais e genéticos normais e anormais relacionados à saúde em mães e filhos. A concentração de 25OHD foi medida no soro no pré-natal e do cordão umbilical e aos 6 anos de idade os pais responderam a Escala de Resposta Social (SRS), uma escala de avaliação que mede a gravidade dos casos relacionados ao TEA e características de TEA na população em geral. As concentrações de 25OHD do sangue do cordão foram menores em comparação com as concentrações no meio da gestação. Deficiência ou menores concentrações de 25OHD foram associadas com pontuações SRS mais altas (crianças mais prejudicadas). Concluíram que bebês expostos a níveis baixos e persistentes de vitamina D do meio da gestação até o nascimento podem aumentar o risco de apresentarem características relacionadas ao TEA (Vinkhuyzen, 2018).

Estudos de comparação de dosagem sérica da vitamina D mostram que há uma maior acurácia quando a vitamina D é dosada por cromatografia líquida associada à espectrofotometria de massa (LC-MS/MS, *liquid chromatography-tandem mass spectrophotometry*), mas este método é de alto custo e demorado, e não acessível a todos os laboratórios. A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, *high-pressure liquid chromatography*) pode ser um teste substituto (Castro, 2011). A presente pesquisa foi realizada através de um ensaio menos dispendioso, o teste ELISA- vitamina D 25-OH. Estudos de comparação mostram que ensaios competitivos manuais (radioimunoensaio, ELISA) e automatizados (quimioluminescência)

apresentam menores confiabilidade e acurácia e maior variabilidade (Castro, 2011). Isso pode ter sido a causa desta pesquisa ter apresentado uma diferença significativa, porém pequena.

Mesmo diante de todas essas evidências ainda há um debate contínuo sobre se a vitamina D deve ser tratada apenas como um suplemento eventualmente usado na profilaxia, ou se também poderia ser considerado de grande importância na terapia de distúrbios múltiplos (Zmijewski, 2019).

Diante de todos esses fatos há indícios de que baixas concentrações de vitamina D pode juntamente a outros fatores contribuir para a etiologia do autismo. O baixo nível de vitamina D pode ser altamente prevalente em populações com TEA e a intervenção com vitamina D pode ser benéfica na redução dos sintomas de autismo (Mazahery, 2016). Portanto, há uma necessidade urgente de ensaios controlados randomizados com a vitamina D em populações geneticamente predispostas ao TEA e em pessoas com o diagnóstico de TEA já confirmados para comprovar esses achados e gerar recomendações clínicas baseadas em evidências para a prevenção do TEA e melhor tratamento dos sinais e sintomas. Até que dados mais evidentes estejam disponíveis, gestores e profissionais da saúde, assim como pesquisadores devem considerar fatores relacionados à vitamina D como potenciais preventivos e medidas modificadoras no TEA.

Esse estudo verificou os níveis séricos de Vitamina D em crianças com TEA. As crianças com o TEA apresentaram uma média de dosagem sérica de vitamina D menor (29,94 ng/mL) que o grupo controle (34,86 ng/mL). Dado também encontrado em pesquisas anteriores. Nesse estudo, também, foi apontado que 18,37% dos sujeitos do grupo experimental apresentaram deficiência de vitamina D e apenas 2,63% dos sujeitos do grupo controle apresentaram deficiência de vitamina D. Em relação a insuficiência 28,57% das crianças com TEA e 28,95% do grupo controle apresentaram insuficiência de vitamina D. E o último dado encontrado em relação a dosagem de vitamina D foi que 53,06% do grupo com TEA e 68,42% do grupo experimental apresentaram níveis suficientes de vitamina D.

Como pontos fortes pôde-se observar que é um estudo de baixo custo, reprodutível e aplicável.

Como pontos fortes desta pesquisa pôde-se observar que é um estudo de baixo custo, reprodutível e aplicável. Como limitações desse estudo podemos citar a

limitação de dados referentes ao peso das crianças, tipo de alimentação, suplementação de vitamina D, informações sobre o pré-natal e o grau de exposição ao sol.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo, assim como os outros apontados nessa dissertação sugerem que pode haver uma associação entre baixos níveis séricos de vitamina D e o TEA. A razão pelos quais os níveis de vitamina D serem baixos em pacientes com o TEA ainda não está claro, assim como as consequências desse déficit no organismo. Diante disso, novas pesquisas com um maior número de participantes, estudos moleculares, randomizados e duplo cegos poderão ser realizados para uma maior comprovação científica acerca desse tema.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JB, Audhya T, McDonough-Means S, Rubin RA, Quig D, Geis E, Gehn E, Loresto M, Mitchell J, Atwood S, Barnhouse S, Lee W. Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity. *Nutr Metab (Lond)*. Jun 8;8(1):34, 2011.

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, VA: American Psychiatric Association, 2013.

Arastoo AA, Khojastehkia H, Rahimi Z, Khafaie MA, Hosseini SA, Mansouri MT, Yosefyshad S, Abshirini M, Karimimalekabadi N, Cheraghi M. Evaluation of serum 25-Hydroxy vitamin D levels in children with autism Spectrum disorder. *Ital J Pediatr*. Dec 17;44(1):150, 2018.

Azzam, Hanan M.E.; Sayyah, Hala; Youssef, Sanaa; Lotfy, Hoda; Abdelhamid, Iman A.; Abd Elhamed, Hala A.; Maher, Shaymaa Autism and vitamin D, *Middle East Current Psychiatry: January - Volume 22 - Issue 1 - p 9-14, 2015.*

Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *Surveillance Summaries*. Abr; Vol. 67 / No. 6: 1-23, 2018.

Bener A, Khattab AO, Al-Dabbagh MM. Is high prevalence of Vitamin D deficiency evidence for autism disorder?: In a highly endogamous population. *J Pediatr Neurosci*. Sep-Dec;9(3):227-33, 2014.

Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. Mar 20;21(3):319-29, 2014.

Cannell JJ, Grant WB. What is the role of vitamin D in autism? *Dermatoendocrinol*. Jan 1;5(1):199-204, 2013.

Castro LCG. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq Bras Endocrinol Metab*;55/8: 566-575, 2011.

Chlebowski C, Green JA, Barton ML, Fein D. Using the Childhood Autism Rating Scale to Diagnose Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*; 40: 787–799, 2010.

Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Jun;39 (2):243-53, 2010.

Compart PJ. The pathophysiology of autism. *Glob Adv Health Med.* Nov;2(6):32-7, 2013.

Fernell E, Bejerot S, Westerlund J, Miniscalco C, Simila H, Eyles D, Gillberg C, Humble MB. Autism spectrum disorder and low vitamin D at birth: a sibling control study. *Mol Autism.* Jan 14;6:3, 2015.

Frans EM, Sandin S, Reichenberg A, et al. Autism Risk Across Generations: A Population-Based Study of Advancing Grandpaternal and Paternal Age. *JAMA Psychiatry*;70(5):516–521, 2013.

Gong ZL, Luo CM, Wang L, Shen L, Wei F, Tong RJ, Liu Y. Serum 25-hydroxyvitamin D levels in Chinese children with autism spectrum disorders. *Neuroreport.* Jan 8;25(1):23-7, 2014.

Hens K. The many meanings of autism: conceptual and ethical reflections. *Developmental Medicine & Child Neurology*; 61: 1025–1029, 2019.

Hyman SL, Levy SE, Myers SM, Council On Children With Disabilities, Section On Developmental And Behavioral Pediatrics. Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics.* Jan;145(1): 1-41, 2020.

Janbek J, Specht IO, Heitmann BL. Associations between vitamin D status in pregnancy and offspring neurodevelopment: a systematic literature review. *Nutr Rev.* May 1;77(5):330-349, 2019.

Jia F, Wang B, Shan L, Xu Z, Staal WG, Du L. Core symptoms of autism improved after vitamin D supplementation. *Pediatrics.* Jan;135(1):e196-8, 2015.

Kerley CP, Power C, Gallagher L, Coghlan D. Lack of effect of vitamin D3 supplementation in autism: a 20-week, placebo-controlled RCT. *Arch Dis Child.* Nov;102(11):1030-1036, 2017.

Kočovská E, Fernell E, Billstedt E, Minnis H, Gillberg C. Vitamin D and autism: clinical review. *Res Dev Disabil.* Sep-Oct;33(5):1541-50, 2012.

Mazahery H, Camargo CA Jr, Conlon C, Beck KL, Kruger MC, von Hurst PR. Vitamin D and Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Nutrients.* Apr 21;8(4):236, 2016.

Maenner MJ, Shaw KA, Baio J, Washington A, Patrick M, DiRienzo M, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States. *MMWR Surveill Summ* 2020; vol 69(No. SS-4):1–12, 2016.

Meguid NA, Hashish AF, Anwar M, Sidhom G. Reduced serum levels of 25-hydroxy and 1,25-dihydroxy vitamin D in Egyptian children with autism. *J Altern Complement Med*. Jun;16(6):641-5, 2010.

Molloy CA, Kalkwarf HJ, Manning-Courtney P, Mills JL, Hediger ML. Plasma 25(OH)D concentration in children with autism spectrum disorder. *Dev Med Child Neurol*. Oct;52(10):969-71, 2010.

Mostafa GA, AL-Ayadhi LY. Reduced serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D in children with autism: Relation to autoimmunity. *Journal of Neuroinflammation*; 9:201: 1-7, 2012.

Oberman LM, Kaufmann WE. Autism Spectrum Disorder Versus Autism Spectrum Disorders: Terminology, Concepts, and Clinical Practice. *Front. Psychiatry*; 11 (484): 1-5, 2020.

Rubenstein E, Young JC, Croen LA, DiGuseppi C, Dowling NF, Lee LC, Schieve L, Wiggins LD, Daniels J. Brief Report: Maternal Opioid Prescription from Preconception Through Pregnancy and the Odds of Autism Spectrum Disorder and Autism Features in Children. *J Autism Dev Disord*. Jan;49(1):376-382, 2019.

Saad K, Abdel-Rahman AA, Elserogy YM, Al-Atram AA, Cannell JJ, Bjørklund G, Abdel-Reheim MK, Othman HA, El-Houfey AA, Abd El-Aziz NH, Abd El-Baseer KA, Ahmed AE, Ali AM. Vitamin D status in autism spectrum disorders and the efficacy of vitamin D supplementation in autistic children. *Nutr Neurosci*. Oct;19(8):346-351, 2016.

Saad K, Abdel-Rahman AA, Elserogy YM, Al-Atram AA, El-Houfey AA, Othman HA, Bjørklund G, Jia F, Urbina MA, Abo-Elela MGM, Ahmad FA, Abd El-Baseer KA, Ahmed AE, Abdel-Salam AM. Randomized controlled trial of vitamin D supplementation in children with autism spectrum disorder. *J Child Psychol Psychiatry*. Jan;59(1):20-29, 2018.

Şengenç E, Kiykım E, Saltık S. Vitamin D levels in children and adolescents with autism. *J Int Med Res*. Jul;48(7), 2020.

Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP). Transtorno do Espectro do Autismo. *Abr*; 5: 1-23, 2019.

Song L, Luo X, Jiang Q, Chen Z, Zhou L, Wang D, Chen A. Vitamin D Supplementation is Beneficial for Children with Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. May 31;18(2):203-213, 2020.

Taylor MJ, Rosenqvist MA, Larsson H, Gillberg C, D'Onofrio BM, Lichtenstein P, Lundström S. Etiology of Autism Spectrum Disorders and Autistic Traits Over Time. *JAMA Psychiatry*. Sep 1;77(9):936-943, 2020.

Teste ELISA - vitamina D 25-OH. EUROIMMUN Diagnóstico Médico-laboratorial Brasil. Gustavo Janaudis CRF/SP – 38946, 2016.

Tostes MHFS, Polonini HC, Gattaz WF, Raposo NRB, Baptista EB. Low serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) in children with autism. *Trends Psychiatry Psychother*. Mai; 34(3):161-3, 2012.

Uğur Ç, Gürkan CK. Serum vitamin D and folate levels in children with autism spectrum disorders. *Res Autism Spectr Disord*; 8:1641–1647, 2014.

Vinkhuyzen AAE, Eyles DW, Burne THJ, Blanken LME, Kruithof CJ, Verhulst F, Jaddoe VW, Tiemeier H, McGrath JJ. Gestational vitamin D deficiency and autism-related traits: the Generation R Study. *Mol Psychiatry*. Feb;23(2):240-246, 2018.

Yu H, Zhang Z, Liu J, Hu P, Liu Z. Association study between genetic variants in vitamin D metabolism related genes and childhood autism spectrum disorder. *Metab Brain Dis*. Aug;35(6):971-978, 2020.

Zmijewski MA. Vitamin D and Human Health. *Int J Mol Sci*. Jan 3;20(1):145, 2019.

ANEXOS

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o (a) Senhor (a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa Dosagem de vitamina D em crianças com Transtorno do Espectro Autista sob a responsabilidade da pesquisadora Paloma Fragoso D. de Moraes. Esse projeto faz parte de uma pesquisa de mestrado realizada pela Universidade de Brasília com o intuito de obter mais conhecimento relacionados a influência da vitamina D em crianças com Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O objetivo desta pesquisa é verificar se pessoas com TEA apresentam baixos níveis de vitamina D no sangue. O (A) Senhor (a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome e do (a) seu (sua) filho (a) não aparecerão sendo mantido o mais rigoroso sigilo de quaisquer informações que permitam identificá-los.

A participação de seu (sua) filho (a) se dará por meio de uma única coleta de sangue. O sangue utilizado será o que sobrar do que já será colhido para o exame de sangue da coleta de rotina.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são os riscos associados com a coleta de sangue, incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar esses riscos. Se o (a) senhor (a) aceitar participar, estará contribuindo para o estudo de novos achados relacionados a pessoas com TEA.

O (A) Senhor (a) pode se recusar a responder ou concordar com qualquer procedimento ou qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o (a) senhor (a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Caso o (a) senhor (a) não queira participar desta pesquisa, o acompanhamento de seu (sua) filho (a) pelo HUB não será afetado.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília (UNB) podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o (a) senhor (a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para Paloma Fragoso (61)98200-1802, disponível inclusive para ligação a cobrar. Ou pelo e-mail palomafdm@yahoo.com.br

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPECS-SES/DF. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 2017 2132 ramal 6878 ou e-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com. Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o (a) senhor (a).

Nome e assinatura do Participante de Pesquisa

Nome e assinatura do Pesquisador Responsável

Brasília, _____ de _____ de 2020.

ANEXO 2

Formulário de coleta de dados

Nome da criança/adolescente: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Nome do Responsável: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ E-mail: _____

- Tem algum diagnóstico médico de doença neurológica? _____
- Faz uso de alguma medicação contínua? Qual? _____
- Faz uso de suplementação de Vitamina D? _____

MUITO OBRIGADA PELA SUA PARTICIPAÇÃO!