

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Natália Mazzocco Sanco

**MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM O USO DE PROBIÓTICOS
NO TRATAMENTO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Porto Alegre

2020

Natália Mazzocco Sanco

**MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM O USO DE PROBIÓTICOS
NO TRATAMENTO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia Clínica.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Simon Coitinho

Porto Alegre

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Sanco, Natália Mazzocco
MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM O USO DE
PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO
AUTISTA / Natália Mazzocco Sanco. -- 2020.
41 f.
Orientador: Adriana Simon Coitinho.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO
EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Uso de probióticos no transtorno do espectro
autista. I. Coitinho, Adriana Simon, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) caracteriza-se por ser uma síndrome com diversos sintomas, incluindo padrões comportamentais limitados, estereotipados ou repetitivos, comprometimento e dificuldade na comunicação e interações sociais reduzidas. A etiologia por trás do TEA não é totalmente conhecida, mas uma série de estudos epidemiológicos apontaram que o desenvolvimento do TEA é multifatorial. Estes estudos sugerem que há interação de vários fatores de risco sendo eles genéticos, epigenéticos e ambientais. Este trabalho revelou, por meio de uma pesquisa bibliográfica, que os pacientes com TEA desenvolvem múltiplas comorbidades, como ansiedade, irritabilidade, distúrbios gastrointestinais, disbiose da microbiota intestinal dentre outros. Diversas são as abordagens utilizadas para o tratamento do TEA, tratamentos farmacológicos, terapias comportamentais e também tratamentos alternativos. Pesquisas com probióticos (micro-organismos vivos que, quando administrados na dose correta, são capazes de conferir benefícios à saúde do seu hospedeiro) mostraram eficácia em uma ampla variedade de problemas de saúde e evidências disponíveis sugerem que os probióticos devem ser considerados um tratamento adjuvante promissor no TEA.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista. Probióticos. Microbiota intestinal.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) are characterized by a syndrome with several symptoms, including limited, stereotyped or repetitive behavioral patterns, deficits and difficulty in communication and reduced social interactions. The etiology behind ASD is not fully known, but a series of epidemiological studies have shown that ASD development is multifactorial. These studies suggest that there is an interaction of several risk factors, which are genetic, epigenetic and environmental. This work revealed, through a bibliographic search, that patients with ASD develop multiple comorbidities such as anxiety, irritability, gastrointestinal disturbances, dysbiosis of the gut microbiota and others. Several approaches are used to treat ASD, pharmacological treatments, behavioral therapies and also alternative treatments. Research with probiotics (live microorganisms that, when administered in the correct dose, are able to confer health benefits to their host) have shown efficacy in a wide variety of health problems and available evidence suggests that probiotics should be considered an adjunctive treatment promising in ASD.

Keywords: Autism spectrum disorder. Probiotics. Gut microbiota.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1.1	Objetivo geral	7
1.1.2	Objetivos específicos.....	7
2	ARTIGO CIENTÍFICO	8
3	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	32
	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CLINICAL AND BIOMEDICAL RESEARCH (CBR).....	34

1 - INTRODUÇÃO

Os transtornos do espectro autista (TEA) caracterizam-se por uma gama de sintomas, incluindo padrões comportamentais limitados, estereotipados ou repetitivos, comprometimento e dificuldade na comunicação e interações sociais reduzidas^{1,2}. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a prevalência mundial de Transtorno do Espectro Autista (TEA) é de uma em cada 160 crianças, sendo que os sintomas começam na infância e tendem a persistir na adolescência e idade adulta¹. Nos últimos anos, a prevalência de TEA aumentou drasticamente: nos Estados Unidos, atualmente, uma em cada 59 crianças é diagnosticada com TEA, e sua prevalência na Europa, embora um pouco menor, é igualmente preocupante, com uma em 89 crianças afetada por TEA². Até o presente momento, o Ministério da Saúde brasileiro não possui dados conclusivos sobre a prevalência da TEA no Brasil; no entanto, estimativas sugerem que dois milhões de indivíduos são afetados pela doença¹.

A etiologia por trás do TEA não é totalmente conhecida, mas uma série de estudos epidemiológicos apontaram que o desenvolvimento do TEA é multifatorial. Estes estudos sugerem que há interação de vários fatores de risco sendo eles genéticos, epigenéticos e ambientais³.

Pacientes com TEA desenvolvem múltiplas comorbidades (por exemplo, distúrbios do ritmo circadiano e do sono, obesidade, epilepsia, hiperatividade e déficit de atenção, deficiência intelectual, ansiedade, irritabilidade, savantismo, comportamento autolesivo, distúrbios motores, desregulação imunológica, distúrbios gastrointestinais e disbiose da microbiota intestinal)³. Além disso, há um aumento na incidência de queixas gastrointestinais nestes pacientes e os sintomas são variáveis, apresentando-se como diarreia, constipação, dor abdominal ou inchaço. Esses distúrbios gastrointestinais podem ser bastante refratários ao tratamento convencional e, portanto, apresentam um desafio para o tratamento⁴.

O tratamento farmacológico disponível (antipsicóticos, inibidores da recaptação da serotonina, anticonvulsivantes, etc.) é usado, principalmente, para gestão de alguns sintomas, pois nenhum fármaco disponível é realmente eficaz para o tratamento do TEA. Além disso, os medicamentos induzem diversos efeitos colaterais como sedação, ganho de peso, fadiga, tremor, tontura, sonolência, prisão de ventre, vômito, etc. Sendo assim, o uso de abordagens alternativas, não farmacológicas para o tratamento do TEA, está sendo cada vez mais estudado².

Como uma dessas alternativas, pode-se citar o uso dos probióticos como adjuvante no tratamento. Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados na dose correta, são capazes de conferir benefícios à saúde do seu hospedeiro⁵. Atualmente, há uma crescente pesquisa sobre a função que eles desempenham no organismo como um todo e não apenas no trato gastrointestinal. Sua inclusão como tratamento em crianças com TEA tem sido incentivada e muito discutida. Alguns estudos estão sendo analisados em grupos com sintomas gastrointestinais e também em grupos com anormalidades imunológicas e/ou comportamentais identificadas na população de TEA⁶.

Com base nas questões apresentadas e no crescente interesse no tema, o presente trabalho fará uma revisão bibliográfica sobre a modulação da microbiota no tratamento do TEA. A pesquisa foi realizada em bases de dados como PubMed, Embase, Scopus, Web of Science e outras fontes no período entre 2010 e 2020. Os termos usados na busca foram “autism spectrum disorder”, “probiotics” and “microbiota”.

1.1.1 Objetivo geral

Realizar uma revisão bibliográfica sobre a modulação da microbiota e o uso de probióticos como uma nova abordagem no tratamento da Síndrome do Espectro Autista.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar quais probióticos podem ou não ser efetivos no autismo;
- b) Identificar quais sintomas do autismo podem ser melhorados pelo uso de probióticos;
- c) Verificar o tempo de administração e a dose dos probióticos utilizadas nos estudos.

2 - ARTIGO CIENTÍFICO

MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM O USO DE PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

MODULATION OF GUT MICROBIOTA USING PROBIOTICS IN THE TREATMENT OF AUTISM SPECTRUM DISORDER

Natália Mazzocco Sanco¹, Adriana Simon Coitinho^{1,2,3}

1 Curso de Especialização em Microbiologia Clínica, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, UFRGS.

2 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia, ICBS, UFRGS.

3 Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, ICBS, UFRGS

Autor correspondente:

Natália Mazzocco Sanco

sanco.natalia@gmail.com

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Rua Sarmiento Leite, 500 - Campus Centro - Porto Alegre/RS

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) caracteriza-se por ser uma síndrome com diversos sintomas, incluindo padrões comportamentais limitados, estereotipados ou repetitivos, comprometimento e dificuldade na comunicação e interações sociais reduzidas. Este trabalho revelou, por meio de uma pesquisa bibliográfica, que os pacientes com TEA

desenvolvem múltiplas comorbidades, como ansiedade, irritabilidade, distúrbios gastrointestinais, disbiose da microbiota intestinal dentre outros. Diversas são as abordagens utilizadas para o tratamento do TEA: abordagens farmacológicas, terapias comportamentais e também tratamentos alternativos. Pesquisas com probióticos mostraram eficácia em uma ampla variedade de problemas de saúde e evidências disponíveis sugerem que os probióticos devem ser considerados como um tratamento adjuvante promissor no TEA.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista. Probióticos. Microbiota intestinal.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) are characterized by a syndrome with several symptoms, including limited, stereotyped or repetitive behavioral patterns, deficits and difficulty in communication and reduced social interactions. This work revealed, through a bibliographic search, that patients with ASD develop multiple comorbidities such as anxiety, irritability, gastrointestinal disturbances, dysbiosis of the gut microbiota and others. Several approaches are used to treat ASD, pharmacological treatments, behavioral therapies and also alternative treatments. Research on probiotics showed efficacy in a wide variety of health problems and available evidence suggests that probiotics should be considered an adjuvant treatment promising in ASD.

Keywords: Autism spectrum disorder. Probiotics. Gut microbiota.

METODOLOGIA

Nesta revisão bibliográfica foram utilizadas referências, principalmente artigos científicos internacionais indexados. A pesquisa foi realizada em bases de dados como

PubMed, Embase, Scopus, Web of Science e outras fontes no período entre 2010 e 2020. Os termos usados na busca foram “autism spectrum disorder”, “probiotics” and “microbiota”.

TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio do desenvolvimento neurológico(1). Caracteriza-se por uma gama de sintomas, incluindo padrões comportamentais limitados, estereotipados ou repetitivos, comprometimento e dificuldade na comunicação e interações sociais reduzidas (2)(3).

Embora o TEA seja um distúrbio muito heterogêneo, com muitas comorbidades psiquiátricas e médicas associadas e como não existem biomarcadores confiáveis, o diagnóstico deve ser feito com base no comportamento e nos sintomas centrais específicos. A versão mais recente do Manual Estatístico de Diagnóstico de Transtornos Mentais, do inglês, “Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders” (DSM-V) completou um ciclo eliminando as subcategorias, Transtorno invasivo do desenvolvimento não especificado de outro modo, Síndrome de Asperger e Transtorno autista, agora descrevendo o autismo como um verdadeiro espectro, dependendo dos níveis de comprometimento (1).

Antes do DSM-V, o autismo era diagnosticado por comprometimento das interações sociais ou da comunicação, além da presença de movimentos repetitivos e/ou interesses restritivos. Atualmente, o DSM-V prevê que as interações sociais e a comunicação são tão inter-relacionadas que são difíceis de separar, sendo assim, combinou-se essas duas deficiências para traduzir em uma, sendo a principal deficiência a anormalidade significativa na comunicação social. O DSM-V agora reconhece apenas o Transtorno do espectro autista como diagnóstico (1).

Para ser diagnosticada com TEA, uma pessoa deve mostrar evidências de dificuldades, passadas ou presentes, em cada um dos três subdomínios da comunicação social, e deve ter ou

ter tido dificuldade em dois dos quatro padrões de comportamentos sensoriais-motores restritos e repetitivos diferentes. Dentre as dificuldades na comunicação social e interação social que devem ser analisadas, podemos citar: 1- Déficits na reciprocidade sócio emocional (por exemplo, abordagem social anormal e falha na conversa normal); ou compartilhamento reduzido de interesses, emoções ou afetos, 2- Déficits nos comportamentos comunicativos não verbais (por exemplo, comunicação verbal e não verbal mal integrada, anormalidades no contato visual e na linguagem corporal ou déficits na compreensão e no uso de gestos) e 3- Déficits no desenvolvimento, manutenção e compreensão de relacionamentos (por exemplo, dificuldades em ajustar o comportamento para se adequar a vários contextos sociais; ou dificuldades em compartilhar brincadeiras imaginativas ou fazer amigos). E ainda, os quatro padrões comportamentais que servem de diagnóstico são manifestados por: 1- Movimentos motores estereotipados ou repetitivos, uso de objetos ou fala (por exemplo, estereotipias motoras simples, alinhando brinquedos ou lançando objetos), 2- Insistência na uniformidade, aderência inflexível às rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal e não verbal (por exemplo, angústia extrema com pequenas mudanças, dificuldades com transições ou padrões rígidos de pensamento), 3- Interesses altamente restritos e fixos que são anormais em intensidade ou foco (por exemplo, forte apego ou preocupação com objetos incomuns) e 4- Hiperreatividade ou hiporreatividade a estímulos sensoriais, ou interesses incomuns em aspectos sensoriais do ambiente (por exemplo, indiferença aparente à dor ou temperatura, ou respostas adversas a sons ou texturas específicas) (4).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a prevalência mundial de Transtorno do Espectro Autista (TEA) é de uma em cada 160 crianças, sendo que os sintomas começam na infância e tendem a persistir na adolescência e na idade adulta (2). Nos últimos anos, a prevalência de TEA aumentou drasticamente: nos Estados Unidos, atualmente, uma em cada 59 crianças é diagnosticada com TEA, e sua prevalência na Europa, embora um pouco menor,

é igualmente preocupante, com uma em 89 crianças afetada por TEA (3). Até o presente momento, o Ministério da Saúde brasileiro não possui dados conclusivos sobre a prevalência de TEA no Brasil; no entanto, estimativas sugerem que dois milhões de indivíduos são afetados pela doença (2).

A etiologia por trás do TEA não é totalmente conhecida, mas uma série de estudos epidemiológicos apontaram que o seu desenvolvimento é multifatorial. Estes estudos sugerem que há interação de vários fatores de risco sendo eles genéticos, epigenéticos e ambientais (5). Há muitas evidências de que as variantes genéticas contribuem substancialmente na etiologia do distúrbio, incluindo deleções e duplicações genéticas, herdadas e não herdadas, chamadas de “*de novo*”, e variantes raras e comuns no TEA. São genes envolvidos na deficiência intelectual e no distúrbio neuropsiquiátrico, genes de vias comuns e genes de risco para TEA, contribuições multigênicas de variações raras ou comuns, mutações no DNA e efeitos ambientais na expressão gênica e/ou na função das proteínas. Estima-se que fatores de risco genéticos raros, incluindo aqueles que resultam em síndromes relacionadas a TEA (por exemplo, Síndrome do X Frágil), anormalidades cromossômicas e genes penetrantes, também contribuam para o distúrbio (6).

A epigenética lida com as alterações no cromossomo que afetam a atividade e a expressão gênica, sem modificação do genoma. Especula-se que as alterações epigenéticas sejam o mecanismo pelo qual as influências ambientais afetam os genes. A desregulação epigenética foi avaliada em distúrbios monogênicos que compartilham o fenótipo com TEA, como a Síndrome de Rett e a Síndrome do X frágil. As alterações epigenéticas geralmente envolvem metilação do DNA e modificações de histonas. A maioria das marcas epigenéticas são apagadas durante a gametogênese, a divisão mitótica do zigoto e assim por diante. No entanto, nem todas as marcas epigenéticas são apagadas e algumas podem ser transmitidas através de gerações (7).

A exposição fetal a pesticidas tem sido associada a baixo peso ao nascer, atraso no desenvolvimento psicomotor e maior risco de TEA. Além disso, estudos epidemiológicos recentes fornecem evidências de que a exposição de gestantes, especialmente durante o 1º ou 2º trimestre, a infecções virais ou bacterianas, promove a ativação imune materna e aumenta o risco de doenças neuropsiquiátricas, incluindo TEA em seus filhos (em 13%) em comparação com filhos de gestantes não expostas (8). A ativação imune materna tem sido associada a um aumento de citocinas neuroinflamatórias, além de anormalidades na expressão de proteínas sinápticas e desenvolvimentos anormais na conectividade sináptica, os quais podem estar subjacentes à fisiopatologia da TEA. A exposição de gestantes a medicamentos psicotrópicos, principalmente durante o primeiro trimestre, também tem sido considerada um fator de risco. Além disso, fetos expostos ao medicamento valproato de sódio têm um risco maior de desenvolver TEA no futuro. Estudos adicionais sugerem que a prescrição de antidepressivos para mulheres grávidas, especificamente, inibidores seletivos da recaptação de serotonina, durante o segundo e/ou terceiro trimestre aumenta o risco de TEA (4)(8).

A exposição prolongada ao alumínio e mercúrio do ambiente, da dieta e de outras fontes também pode contribuir para o risco de TEA. As condições metabólicas maternas (por exemplo, hipertensão, diabetes mellitus e obesidade) também tem sido descritas (3).

A idade dos pais está associada a distúrbios do desenvolvimento neurológico e é considerada um fator de risco para o distúrbio. Pesquisas sugerem que ambos os extremos da idade dos pais têm implicações na ocorrência do transtorno. Adicionalmente, talvez o aumento de novas mutações observadas com o avanço da idade seja um fator que vincule a idade a um risco aumentado de TEA (7).

O tratamento utilizado para o TEA é uma combinação do uso de medicamentos com terapias comportamentais. Os tratamentos farmacológicos são utilizados para gerenciar alguns comportamentos e comorbidades, como distúrbios do sono e ansiedade ou transtorno de

déficit de atenção/hiperatividade (TDAH) que não podem ser tratados com intervenções comportamentais (3).

Apenas dois medicamentos foram oficialmente aprovados pelo FDA americano, do inglês “*Food and Drug Administration*” (órgão que controla e fiscaliza os alimentos e medicamentos), para o tratamento dos sintomas de TEA: o aripiprazol e a risperidona, antipsicóticos atípicos que demonstraram melhora na irritabilidade e agitação, que inclui agressão, automutilação e outros comportamentos perturbadores. Ambos os medicamentos também podem causar efeitos adversos, incluindo sedação e ganho de peso, aumentando o risco de problemas de saúde posteriores (4). Inibidores seletivos da recaptação de serotonina, como Fluoxetina, Sertralina, Escitalopram e Venlafaxina, têm sido usados no tratamento de transtornos de ansiedade e depressão e demonstraram facilitar as dificuldades sociais em crianças com TEA, pois a hiperserotonemia é frequentemente observada em crianças com TEA (3)(8).

Vários outros fármacos foram testados para o tratamento de diferentes sintomas de TEA, como Clozapina (um antipsicótico atípico); Clomipramina (um antidepressivo tricíclico); Lamotrigina, Ácido valpróico, Levetiracetam (todos anticonvulsivantes); Rivastigmina, Donepezil, Galantamina (todos inibidores da acetilcolinesterase); Amantadina, Memantina (ambos antagonistas do glutamato); e o psicoestimulante, metilfenidato (3).

O uso da fitoterapia, medicamentos à base de plantas como *Gingko biloba*, *Zingiber officinale* (gingibre), *Astragalus Membranaceus*, *Centella asiatica* (gotu cola) e *Acorus Calamus* (Calamus) quando usados em combinação com a terapia convencional, mostraram resultados promissores na melhoria de comportamentos anormais e desatenção em pacientes com TEA. Estes resultados basearam-se em seus efeitos somáticos, incluindo aumento da circulação cerebral com melhora das funções cognitivas, esforço de efeito calmante ou sedativo e melhora da resposta imune (8).

Além disso, a melatonina, um neuro-hormônio produzido a partir da serotonina na glândula pineal e secretado durante a noite, também tem sido usada para reduzir problemas relacionados aos distúrbios do sono em crianças com TEA, com efeitos benéficos na ansiedade, depressão, estresse, transtorno do humor, dor e disfunções gastrointestinais. Seu principal papel parece ser a organização dos ritmos circadianos, incluindo os ciclos de vigília e de temperatura corporal. Estudos demonstraram que este produto, considerado um suplemento nutricional, pode ser eficaz na promoção do sono e parece não ter efeitos colaterais adversos a longo prazo (9).

Além das várias comorbidades associadas ao TEA (por exemplo, problemas gastrointestinais, déficits específicos de micronutrientes, problemas digestivos, distúrbios do sono, etc.), o uso de tratamentos complementares e alternativos tem sido considerado uma estratégia promissora para reduzir a carga de sintomas do transtorno, evitando os efeitos colaterais associados ao uso de medicamentos. Intervenções não farmacológicas, abrangendo terapias comportamentais, de massagem, estímulos audiovisuais e realidade virtual, musicoterapia que mostrou evidências promissoras na melhora da interação social e da comunicação verbal, terapia cognitivo-comportamental (8), terapias com animais/animais de estimação entre outras, são usados para tratar comportamentos estereotipados e repetitivos em crianças com TEA (3).

O uso de terapias celulares e, em particular, o transplante de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais da medula óssea (ou sangue do cordão umbilical), expandiu-se de malignidades hematológicas para outras doenças, incluindo condições neurológicas, como o TEA. As terapias com células-tronco hematopoiéticas fornecem uma extensa reposição enzimática que pode ajudar a prevenir a degeneração neurológica e prolongar a vida de crianças com o distúrbio. As células-tronco geralmente sintetizam e liberam várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que podem suprimir o status pró-inflamatório

observado em crianças com TEA, afetando os níveis de citocinas inflamatórias no sangue. Além disso, as células-tronco podem estimular o recrutamento e a diferenciação de células-tronco nativas residentes em tecidos (3).

Além disso, o uso de suplementos nutricionais e intervenções alimentares para o manejo do TEA está sendo explorado. Isso se justifica porque crianças com distúrbios do espectro do autismo apresentam maior seletividade alimentar, o que restringe o consumo de alguns alimentos e pode causar deficiências nutricionais, associadas a problemas gastrointestinais e à disbiose da microbiota intestinal. De acordo com uma meta-análise recente, crianças com TEA tendem a consumir menos proteínas, cálcio, fósforo, selênio, vitamina D, tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), e cobalamina (vitamina B12) e mais ácidos graxos poli-insaturados, vitamina E, frutas e vegetais. Também foi descoberto que estas crianças tendem a consumir menos laticínios do que crianças com desenvolvimento típico. O baixo consumo de produtos lácteos entre crianças autistas pode ser devido à hipótese amplamente conhecida de que o leite pode agravar os sintomas do autismo por causa da proteína caseína, que se transforma em β -casomorfina-7 opióide (BMC-7, um peptídeo opióide) no intestino. Embora a função biológica do BMC-7 não seja clara, ela pode ter influência nos sistemas gastrointestinal, imunológico e nervoso. Crianças com TEA podem ter maior permeabilidade intestinal e uma alteração na enzima dipeptidil peptidase IV (DPPIV), que está envolvida no metabolismo da β -casomorfina-7. O peptídeo pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e atingir o sistema nervoso central, causando alterações no comportamento da criança e agravando os sintomas do TEA (10).

Outros estudos descobriram que crianças com TEA têm respostas imunes anormais a certos alimentos, especialmente ao glúten (no trigo, centeio, cevada, aveia) e às vezes soja, sendo uma opção terapêutica a exclusão destes alimentos da dieta. A suplementação com ácidos graxos poli-insaturados como o ômega-3 e ômega-6, importantes para a função da

membrana intestinal e diminuição da inflamação corporal, podem ser benéficas para reduzir alguns problemas gastrointestinais, pois no geral estes ácidos graxos encontram-se diminuídos em crianças com a síndrome (11).

Embora a etiologia e a patologia exata do TEA permaneçam incertas, um distúrbio do eixo microbiota-intestino-cérebro está emergindo como um fator proeminente na geração de comportamentos autistas. Estudos clínicos demonstraram que sintomas gastrointestinais e alterações na composição da microbiota intestinal frequentemente acompanham distúrbios cerebrais em pacientes com TEA, portanto a aplicação de moduladores deste eixo microbiota-intestino-cérebro, têm sido usados com sucesso. Estes moduladores são os probióticos (12).

PROBIÓTICOS

Os probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”(13)(14)(15)(16). Muitos são derivados da microbiota comensal do intestino humano saudável e suas propriedades imitam as dos efeitos homeostáticos da microbiota intacta. Os probióticos modulam de forma benéfica a composição da microbiota, inibindo o crescimento e a adesão ao epitélio intestinal (17) de bactérias potencialmente patogênicas através da produção de bacteriocinas e da criação de um meio mais ácido que é hostil às bactérias pró-inflamatórias, mas promove o crescimento de espécies benéficas, como lactobacilos e bifidobactérias. Os probióticos aumentam a diversidade bacteriana e diminuem a diversidade de fungos, e também podem aumentar a produção de ácidos graxos que possuem propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogênicas (14). Podem também, a nível intestinal, ajudar a reparar a permeabilidade, melhorar a resposta imune e ajustar positivamente a absorção de eletrólitos. (17)

Eles podem ser classificados em quatro categorias: produtos derivados de leite inoculados com cepa (s) probiótica (s) com efeitos benéficos bem definidos; produtos não

lácteos fermentados com cepa (s) probiótica (s); produtos não fermentados com adição de cepa (s) probiótica (s) e suplementos contendo linhagens probióticas (15). Os efeitos bem estabelecidos dos probióticos na saúde variam de acordo com a espécie e cepa específica escolhida, com base nas diferenças genéticas e na natureza das interações bactéria-hospedeiro (18).

Pesquisas com probióticos mostraram eficácia em uma ampla variedade de problemas de saúde. Conforme estudo realizado com o uso de *Lactobacillus plantarum* DR7 em infecções do trato respiratório inferior, constatou-se que estes probióticos podem exercer um papel protetor contra as infecções através da indução de efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios enquanto promovem a integridade da barreira mucosa e aumento da atividade fagocítica e natural das células *natural killer* (NK), linfócitos conhecidos como assassinos naturais. Também foram capazes de reduzir os sintomas nasais e o número de ocorrências das infecções no trato respiratório inferior e também reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), e aumento de citocinas anti-inflamatórias plasmáticas, como interleucina-10 (IL-10) e interleucina-4 (IL-4) (19).

Os probióticos são amplamente utilizados por pacientes com doença intestinal inflamatória (DII) e frequentemente recomendados por seus médicos, geralmente como terapia adjuvante (14). A doença é caracterizada pela ativação imune no trato gastrointestinal, causando inflamação e danos à mucosa ou submucosa. A colite ulcerativa difere da doença de Crohn na apresentação, com a atividade da doença focada no cólon e reto, na colite, e a atividade intermitente da doença em todo o trato gastrointestinal na doença de Crohn. A DII é caracterizada por respostas imunes inatas e adaptativas ativadas, com resposta variando por tipo de DII (20).

Outros distúrbios gastrointestinais como diarreia infecciosa aguda associada a antibióticos e síndrome do intestino irritável (IBS) demonstraram ser responsivas aos probióticos. Alguns estudos relatam que a administração de probióticos pode melhorar a constipação na população em geral, melhorando o trânsito colônico, a frequência de defecação e o endurecimento das fezes. As cepas que produzem estes efeitos são o DN-173 010 cepa de *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus paracasei*, leite fermentado com *Bifidobacterium* e espécies de *Lactobacillus*. No entanto, sua eficácia é controversa porque alguns estudos relatam apenas efeitos muito leves (15)(16).

Há também, evidências disponíveis que sugerem que os probióticos devem ser considerados um tratamento adjuvante promissor para reduzir a ativação inflamatória comumente encontrada no transtorno depressivo maior (TDM). Numerosos estudos indicaram que a ativação inflamatória periférica e central persistente de baixo grau está associada ao diagnóstico de TDM, gravidade dos sintomas depressivos em pacientes com este transtorno e risco de não resposta ao tratamento. A atividade inflamatória periférica também está ligada a alterações na fisiologia, no comportamento cerebral e no humor. Estudos demonstraram que 45% dos pacientes que não responderam aos antidepressivos convencionais apresentaram níveis elevados de proteína C-reativa (PCR). Isso sugere que os probióticos podem potencialmente melhorar a atividade antidepressiva por meio da redução da inflamação. Os probióticos também podem melhorar indiretamente os sintomas depressivos através de seus efeitos na obesidade, diabetes e/ou outras complicações metabólicas. A obesidade e a inflamação persistente de baixo grau têm sido associadas a disfunções intestinais, incluindo aumento da permeabilidade intestinal e alterações na composição da microbiota intestinal, chamada de disbiose intestinal. A disbiose é uma alteração na composição da microbiota intestinal normal. Pode-se destacar o relacionamento entre o cérebro, a microbiota intestinal e

o sistema imunológico, bem como as alterações da microbiota como uma possível fonte de atividade inflamatória nos transtornos do humor (21).

Um estudo realizado na Nova Zelândia fornece evidências de que a suplementação com *Lactobacillus rhamnosus* HN001 na gravidez e no pós-parto reduz a prevalência de sintomas de depressão pós-natal e ansiedade no pós-parto em mulheres saudáveis (22). Outro estudo realizado no Japão, um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo com duração de 12 semanas, foi usado para avaliar as funções imunomoduladoras e relacionadas ao estresse em um grupo de voluntários adultos saudáveis. Foi avaliado um grupo com consumo de iogurte placebo e outro com consumo de iogurte contendo os probióticos *Lactobacillus gasseri* SBT2055 e *Bifidobacterium longum* SBT2928. O ensaio demonstrou que o iogurte teste contendo os probióticos teve o potencial de melhorar a imunidade inata aumentando a atividade das células *natural killer* (NK). Também foi observado que a magnitude desse efeito depende do gênero e da idade; ou seja, a ativação da atividade das células NK foi muito maior em indivíduos do sexo feminino ou com menos de 65 anos. Para a análise de subgrupo dos efeitos nos níveis séricos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol sérico, houve uma diminuição significativa desses dois hormônios do estresse pela ingestão do iogurte de teste. Desta vez a diminuição foi maior em indivíduos do sexo masculino ou com menos de 65 anos. De maneira semelhante, foi observada uma tendência de redução do cortisol salivar no subgrupo masculino, como observado no nível sérico de cortisol (23).

Com a crescente pesquisa sobre probióticos e o papel que desempenham na saúde não apenas do trato gastrointestinal (GI), mas do organismo como um todo, sua inclusão como tratamento integrador pode ser útil para pessoas com transtorno do espectro autista (TEA) (18).

USO DE PROBIÓTICOS NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Diversas espécies de microrganismos são habitantes naturais do trato gastrointestinal saudável, os mais comuns são os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (ambos representam até 70 – 90% do total de bactérias), seguidos por *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* (24). Bactérias anaeróbicas, leveduras, vírus e bacteriófagos (vírus que residem e proliferam dentro das bactérias) também influenciam a diversidade microbiana intestinal (25).

Existe um consenso geral de que problemas gastrointestinais (GI) são comuns em indivíduos com transtorno do espectro autista e que estes problemas pioram significativamente seu comportamento e sua qualidade de vida. As complicações gastrointestinais em crianças com TEA podem contribuir para a gravidade do distúrbio. A causa desses problemas gastrointestinais não é clara, mas parece estar parcialmente relacionada à microbiota intestinal anormal, possivelmente causada por uma dieta mais restrita e ao uso excessivo de antibióticos orais que podem alterar a microbiota intestinal normal (26).

Pacientes com TEA foram relatados como tendo diferentes composições da microbiota intestinal em comparação com controles neurotípicos. Houve observações de concentrações mais altas de bactérias *Clostridium* patogênicas, diminuição da razão *Bacteroides/Firmicutes* e aumento das espécies *Lactobacillus* e *Desulfovibrio* (25)(27).

Um estudo de Hsiao e colaboradores (2013) demonstrou os papéis do probiótico *Bacteroides fragilis* na melhoria dos comportamentos associados ao TEA, bem como na modulação de vários metabólitos. Neste estudo, os autores criaram um modelo de MIA (modelo de camundongo de ativação imune materna) para avaliar a influência do microbioma intestinal em comportamentos sindrômicos. Os filhos de MIA exibiram

alterações da integridade da barreira GI e defeitos funcionais na permeabilidade intestinal, além de alterações microbianas. Além disso, os filhos de MIA exibiram comportamentos estereotipados semelhantes à TEA e diferenças no perfil metabolômico sérico. A administração oral do probiótico *Bacteroides fragilis* corrigiu a permeabilidade intestinal e também melhorou alterações específicas na microbiota comensal da prole de MIA. Notavelmente, o tratamento com *Bacteroides fragilis* melhorou alguns defeitos comportamentais, incluindo déficits comunicativos, comportamentos estereotipados, semelhantes a ansiedade e melhora no sensório-motor (28).

Em outro estudo com crianças na Eslováquia foi feita a suplementação probiótica de uma cápsula de “Children Dophilus” contendo 3 cepas de *Lactobacillus* (60%), 2 cepas de *Bifidumbacteria* (25%) e uma cepa de *Streptococcus* (15%) administrada por via oral três vezes ao dia durante 4 meses (29). Após a implementação do probiótico, a quantidade de *Firmicutes* diminuiu significativamente, o que resultou no aumento da razão *Bacteroidetes/Firmicutes* para o nível dos indivíduos saudáveis. A partir da investigação das fezes de crianças autistas, a quantidade de *Bifidobacterium* diminuiu significativamente após a intervenção probiótica e atingiu o nível do conteúdo gastrointestinal de indivíduos saudáveis. A quantidade absoluta de *Lactobacillus* teve uma tendência de queda, atingindo um nível não significativamente diferente das crianças saudáveis. Por outro lado, a quantidade relativa de *Lactobacillus* aumentou duas vezes após a administração de probiótico contendo 60% de *Lactobacillus*. *Desulfovibrio* - um agente etiopatogénico suspeito de gravidade no autismo com relação ao comportamento restrito/repetitivo, diminuiu significativamente após a terapia probiótica. Houve também uma diminuição significativa nos níveis de TNF α nas fezes de crianças com autismo. Há uma forte correlação entre os níveis de TNF α e os sintomas GI, além disso, os dados mostraram uma tendência de

correlação dos níveis fecais de TNF α com a gravidade do autismo, que apoia a teoria do envolvimento da inflamação GI e da permeabilidade na gravidade do autismo (29).

Em um outro estudo de intervenção duplo-cego controlado por placebo em crianças com TEA foi administrado, por 30-108 dias, uma mistura de quatro cepas probióticas, incluindo *Bifidobacterium infantis* Bi-26, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Bifidobacterium lactis* BL-04, e *Lactobacillus paracasei* LPC- 37, que contém 10^{10} UFC/pacote/dia. Além disso, fruto-oligossacarídeo (FOS) foi administrado junto com os probióticos. O FOS é um fator de crescimento de *Bifidobacterium*, e pode estimular o crescimento de probióticos (30). Um aumento nas bactérias benéficas (*Bifidobacteriales* e *B. longum*) e supressão de bactérias patogênicas suspeitas (*Clostridium*) surgiu após a intervenção de probióticos + FOS, com redução significativa na gravidade dos sintomas autistas avaliada com base nas categorias de fala/linguagem/comunicação e sociabilidade e, dos sintomas gastrointestinais. Em comparação com as crianças do grupo controle, foram encontrados níveis significativamente mais baixos de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sendo ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico antes da intervenção de probióticos + FOS. Os AGCC desempenham um papel modulador vital no eixo microbiota-intestino-cérebro, mediando o comportamento e a fisiologia intestinal, são produzidos como produtos de fermentação das bactérias intestinais. Esta diminuição fornece evidências da capacidade de fermentação reduzida destas bactérias. Também foram observados um estado hiperserotonérgico (aumento da serotonina) e um distúrbio no metabolismo da dopamina (diminuição do ácido homovanílico) em crianças com TEA. Curiosamente, os ácidos graxos de cadeia curta acima citados em crianças com autismo aumentaram significativamente após a intervenção de probióticos + FOS e se aproximaram daqueles no grupo de controle. Além disso, os dados demonstraram que a diminuição da serotonina e o aumento do ácido homovanílico surgiram após a intervenção com probióticos + FOS (30).

Estudos em modelos animais mostraram que os AGCC podem cruzar a barreira hematoencefálica e influenciar o desenvolvimento do cérebro ao modular a produção dos neurotransmissores serotonina e dopamina. Os estados desordenados de AGCC e neurotransmissores induzidos por distúrbios da microbiota intestinal em crianças com TEA podem contribuir para a gênese e o desenvolvimento de TEA. Neste estudo concluiu-se que a intervenção de probióticos + FOS pode modular a microbiota intestinal (30).

Um ensaio clínico aberto avaliou o impacto da terapia de transferência de microbiota através do transplante de microbiota fecal estendido na composição da microbiota intestinal e nos sintomas gastrointestinais e do TEA de 18 crianças com diagnóstico da síndrome. Houve redução de aproximadamente 80% dos sintomas gastrointestinais no final do tratamento, incluindo melhorias significativas nos sintomas de constipação, diarreia, indigestão e dor abdominal. Da mesma forma, as avaliações clínicas mostraram que os sintomas comportamentais de TEA (irritabilidade, hiperatividade, letargia, estereotipia e fala aberrante) melhoraram significativamente e permaneceram 8 semanas após o término do tratamento. E ainda, a diversidade bacteriana geral e a abundância de *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Desulfovibrio* entre outros, aumentaram após o tratamento (31).

Em um estudo randomizado, duplo-cego, cruzado em crianças de 2 a 11 anos com TEA, 87,5% do sexo masculino nos EUA avaliou o uso do probiótico *Bifidobacterium infantis* em combinação com um produto de colostro bovino como fonte de oligossacarídeos prebióticos durante 12 semanas. Como resultados obtiveram redução na frequência de certos sintomas GI, bem como redução na ocorrência de comportamentos aberrantes específicos. A melhora pode ser explicada por uma redução na produção de IL-13 e TNF- α nos participantes (32). Outro estudo com crianças autistas que suplementaram por via oral, duas vezes ao dia, por 2 meses cápsulas do probiótico *Lactobacillus acidophilus* (cepa Rosell-11, contendo 5×10^9 UFC / g) concluiu que os probióticos reduziram o D-arabinitol e a proporção de D- / L-

arabinitol (DA / LA) na urina de crianças com autismo, sugerindo a eficácia dos probióticos na prevenção da colonização gastrointestinal por espécies de *Candida spp.* e também observaram uma melhoria significativa na capacidade de concentração e execução de pedidos (33).

COMUNICAÇÃO CÉREBRO – INTESTINO – MICROBIOTA

O eixo intestino-cérebro consiste na comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central e o entérico, ligando os centros emocionais e cognitivos do cérebro às funções intestinais periféricas, sendo que a microbiota intestinal pode influenciar nessas interações. Essa comunicação entre cérebro-intestino-microbiota parece ser bidirecional, ou seja, é feita por meio da sinalização da microbiota intestinal para o cérebro e do cérebro para a microbiota intestinal por meio de ligações neurais, endócrinas, imunológicas e humorais. A comunicação da microbiota com o cérebro envolve o nervo vago, que transmite informações do ambiente luminal para o sistema nervoso central. Na verdade, os efeitos neuroquímicos e comportamentais não estavam presentes em camundongos vagotomizados, identificando o vago como a principal via de comunicação constitutiva modulatória entre a microbiota e o cérebro (34).

A microbiota intestinal também regula os principais neurotransmissores centrais, como a serotonina, alterando os níveis de precursores; por exemplo, *Bifidobacterium infantis* mostrou elevar os níveis de triptofano no plasma e, assim, influenciar a transmissão da serotonina central (5HT) (35).

Curiosamente, a síntese e a liberação de neurotransmissores por bactérias foram relatadas: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium spp.* podem produzir ácido γ -aminobutírico (GABA); *Escherichia*, *Bacillus* e *Saccharomyces spp.* podem produzir noradrenalina; *Candida*, *Streptococcus*, *Escherichia* e *Enterococcus spp.* podem

produzir serotonina; *Bacillus* podem produzir dopamina; e *Lactobacillus* podem produzir acetilcolina. Esses neurotransmissores sintetizados microbialmente podem atravessar a camada mucosa do intestino, embora seja altamente improvável que influenciem diretamente a função cerebral. Mesmo que entrem na corrente sanguínea, o que não é certo, são incapazes de cruzar a barreira hematoencefálica (BHE). Seu impacto na função cerebral é provavelmente indireto, agindo no sistema nervoso entérico. AGCCs, que incluem butirato, propionato e acetato, são produtos metabólicos essenciais da atividade microbiana no intestino e podem exercer efeitos centrais através de receptores acoplados à proteína G, embora esses receptores estejam esparsamente concentrados no cérebro. É mais provável que atuem como moduladores epigenéticos por meio de histonas desacetilases. Os AGCCs também estão envolvidos no equilíbrio energético e no metabolismo e podem modular o tecido adiposo, o tecido hepático e o músculo esquelético. A sinalização imunológica do intestino para o cérebro, mediada por moléculas de citocinas, é outra via de comunicação documentada. As citocinas produzidas no nível do intestino podem viajar através da corrente sanguínea até o cérebro. Em circunstâncias fisiológicas normais, é improvável que eles cruzem a BHE mas evidências crescentes indicam uma capacidade de sinalizar através da BHE e de influenciar áreas do cérebro, como o hipotálamo, onde a barreira é deficiente. É por esse último mecanismo que as citocinas, interleucina (IL) -1 e IL-6 ativam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, promovendo a liberação de cortisol, ativador mais potente do sistema de estresse (35).

Foi demonstrado que tanto o estresse agudo quanto o crônico podem reduzir a secreção de água e aumentar a secreção de íons no intestino e, portanto, prejudicar a proteção física da camada epitelial e da lâmina própria contra a adesão de bactérias nocivas e produtos químicos nociceptivos. Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e aumento da produção de fator de liberação de corticotropina, ativação alterada do sistema vagal, ativação de

mastócitos e liberação de certas citocinas, como IFN- γ , TNF- α , e IL-4 são os culpados sugeridos nesta interação. Além disso, o estresse pode alterar a função das células imunes associadas à mucosa e causar aumento da captação antigênica e bacteriana. Vários estudos foram publicados que mostraram que a composição da microbiota intestinal é alterada em face do estresse agudo ou crônico, e isso, por sua vez, pode alterar subsequentemente a função da barreira intestinal(36)(37) .

Como mencionado acima, a interação entre o intestino e o cérebro é bidirecional, o SNC pode afetar a permeabilidade intestinal e o aumento da permeabilidade intestinal, por sua vez, pode alterar a função do SNC (36)(37).

CONCLUSÃO

Estudos demonstraram que a suplementação com probióticos pode modular a microbiota intestinal impactando positivamente a comunidade microbiana e melhorando o quadro clínico do portador de TEA através da alteração de metabólitos possivelmente prejudiciais. Existe uma predisposição genética na etiologia do autismo, no entanto, não está claro se essa alteração genética reflete ou interfere na expressão de genes que altera diretamente o sistema nervoso ou que expressam proteínas intestinais e do sistema imune. Isto poderia possibilitar que neurotoxinas atinjam o sistema nervoso, causando a sintomatologia do TEA e, conseqüentemente, transtornos do comportamento alimentar, dentre outros. A necessidade de novas pesquisas é evidente, a fim de melhorar o conhecimento sobre a etiopatogênese e, desta forma, criar novas terapias para melhorar a condição clínica dos indivíduos acometidos. Desta forma, embora pareça muito promissora a utilização dos probióticos no TEA, novos estudos são necessários para implementar esta abordagem no manejo clínico destes pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Frye RE. Social Skills Deficits in Autism Spectrum Disorder: Potential Biological Origins and Progress in Developing Therapeutic Agents. *CNS Drugs* [Internet]. 2018 Aug 14;32(8):713–34. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40263-018-0556-y>
2. Brasileira R, Lázaro C, Pereira Pondé M, Rodrigues LE. DO PROBIOTICS EXERT BENEFICIAL EFFECTS ON THE MANIFESTATIONS OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS? [Internet]. Vol. 21, Jan./Abr. 2017. Available from: <http://www.revneuropsiq.com.br>
3. Pistollato F, Forbes-Hernández TY, Calderón Iglesias R, Ruiz R, Elexpuru Zabaleta M, Cianciosi D, et al. Pharmacological, non-pharmacological and stem cell therapies for the management of autism spectrum disorders: A focus on human studies. *Pharmacol Res* [Internet]. 2020;152(September 2019):104579. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104579>
4. Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet* [Internet]. 2018;392(10146):508–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
5. Packer A. Neocortical neurogenesis and the etiology of autism spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2016;64:185–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.002>
6. Masi A, DeMayo MM, Glozier N, Guastella AJ. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. *Neurosci Bull* [Internet]. 2017 Apr 17;33(2):183–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12264-017-0100-y>
7. Gyawali S, Patra BN. Autism spectrum disorder: Trends in research exploring etiopathogenesis. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019;73(8):466–75.
8. Sharma SR, Gonda X, Tarazi FI. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2018;190:91–104. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.007>
9. Bauman ML. Medical comorbidities in autism: Challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2010;7(3):320–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nurt.2010.06.001>
10. Esteban-Figuerola P, Canals J, Fernández-Cao JC, Arija Val V. Differences in food consumption and nutritional intake between children with autism spectrum disorders

- and typically developing children: A meta-analysis. *Autism*. 2019;23(5):1079–95.
11. Adams JB, Audhya T, Geis E, Gehn E, Fimbres V, Pollard EL, et al. Comprehensive nutritional and dietary intervention for autism spectrum disorder—a randomized, controlled 12-month trial. *Nutrients*. 2018;10(3):1–43.
 12. Li Q, Zhou JM. The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. Vol. 324, *Neuroscience*. 2016.
 13. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506–14.
 14. Abraham BP, Quigley EMM. Probiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2017;46(4):769–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.08.003>
 15. Martínez-Martínez MI, Calabuig-Tolsá R, Cauli O. The effect of probiotics as a treatment for constipation in elderly people: A systematic review. *Arch Gerontol Geriatr*. 2017;71(October 2016):142–9.
 16. Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat Med* [Internet]. 2019;25(5):716–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>
 17. Wilkins T, Sequoia J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician*. 2017;96(3):170–8.
 18. Critchfield JW, van Hemert S, Ash M, Mulder L, Ashwood P. The Potential Role of Probiotics in the Management of Childhood Autism Spectrum Disorders. *Gastroenterol Res Pract* [Internet]. 2011;2011:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/grp/2011/161358/>
 19. Chong HX, Yusoff NAA, Hor YY, Lew LC, Jaafar MH, Choi SB, et al. *Lactobacillus plantarum* DR7 improved upper respiratory tract infections via enhancing immune and inflammatory parameters: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Dairy Sci* [Internet]. 2019;102(6):4783–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-16103>
 20. Rasmussen HE, Hamaker BR. Prebiotics and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2017;46(4):783–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.08.004>
 21. Park C, Brietzke E, Rosenblat JD, Musial N, Zuckerman H, Raguett RM, et al.

- Probiotics for the treatment of depressive symptoms: An anti-inflammatory mechanism? *Brain Behav Immun*. 2018;73(June):115–24.
22. Slykerman RF, Hood F, Wickens K, Thompson JMD, Barthow C, Murphy R, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial. *EBioMedicine* [Internet]. 2017;24:159–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.09.013>
 23. Nishihira J, Kagami-Katsuyama H, Tanaka A, Nishimura M, Kobayashi T, Kawasaki Y. Elevation of natural killer cell activity and alleviation of mental stress by the consumption of yogurt containing *Lactobacillus gasseri* SBT2055 and *Bifidobacterium longum* SBT2928 in a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Funct Foods* [Internet]. 2014;11(C):261–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.002>
 24. Yang Y, Tian J, Yang B. Targeting gut microbiome: A novel and potential therapy for autism. *Life Sci* [Internet]. 2018;194(December 2017):111–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.027>
 25. Navarro F, Liu Y, Rhoads JM. Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders? *World J Gastroenterol*. 2016;22(46):10093–102.
 26. Krajmalnik-Brown R, Lozupone C, Kang D-W, Adams JB. Gut bacteria in children with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex community influences a complex disease. *Microb Ecol Heal Dis*. 2015;26(0):1–8.
 27. Ng QX, Loke W, Venkatanarayanan N, Lim DY, Soh AY Sen, Yeo WS. A Systematic Review of the Role of Prebiotics and Probiotics in Autism Spectrum Disorders. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2019 May 10 [cited 2019 Dec 7];55(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31083360>
 28. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* [Internet]. 2013;155(7):1451–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>
 29. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, et al. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiol Behav* [Internet]. 2015;138:179–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.033>
 30. Wang Y, Li N, Yang JJ, Zhao DM, Chen B, Zhang GQ, et al. Probiotics and fructo-

- oligosaccharide intervention modulate the microbiota-gut brain axis to improve autism spectrum reducing also the hyper-serotonergic state and the dopamine metabolism disorder. *Pharmacol Res* [Internet]. 2020;157(November 2019):104784. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104784>
31. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome* [Internet]. 2017;5(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7>
 32. Sanctuary MR, Kain JN, Chen SY, Kalanetra K, Lemay DG, Rose DR, et al. Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *PLoS One*. 2019;14(1):1–30.
 33. Kałużna-Czaplińska J, Błaszczuk S. The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. *Nutrition*. 2012;28(2):124–6.
 34. Carabotti M, Scirocco A, Antonietta Maselli M, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems [Internet]. Vol. 28. 2015. Available from: www.annalsgastro.gr
 35. Dinan TG, Cryan JF. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. Vol. 46, *Gastroenterology Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2017. p. 77–89.
 36. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*. 2010 Nov;170(4):1179–88.
 37. Velin AK. Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut* [Internet]. 2004 Apr 1;53(4):494–500. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2003.028506>

3 - CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Antes de fazer uma conclusão definitiva sobre o efeito benéfico do uso de probióticos, deve-se levar em consideração o fato bem estabelecido de que os efeitos dos probióticos na saúde variam dentro das espécies e cepas particulares, com base nas diferenças genéticas e na sua natureza e, portanto, o probiótico deve ser selecionado individualmente.

Estudos concordam que a suplementação com dieta probiótica promove alteração na microbiota intestinal e melhora no quadro clínico do portador de TEA. Existe uma predisposição genética na etiologia do autismo, no entanto, não está claro se essa alteração genética reflete ou interfere na expressão de genes que alteram diretamente o sistema nervoso ou que expressam proteínas intestinais e do sistema imune. Isto poderia possibilitar que neurotoxinas atinjam o sistema nervoso, causando a sintomatologia do TEA e, conseqüentemente, transtornos do comportamento alimentar, dentre outros. A necessidade de novas pesquisas é evidente, a fim de melhorar o conhecimento sobre a etiopatogênese e, desta forma, criar novas terapias para diminuir os sintomas dos indivíduos acometidos.

REFERÊNCIAS

1. Brasileira R, Lázaro C, Pereira Pondé M, Rodrigues LE. Do probiotics exert beneficial effects on the manifestations of autism spectrum disorders? [Internet]. Vol. 21, Jan./Abr. 2017. Available from: <http://www.revneuropsiq.com.br>.
2. Pistollato F, Forbes-Hernández TY, Calderón Iglesias R, Ruiz R, Elexpuru Zabaleta M, Cianciosi D, et al. Pharmacological, non-pharmacological and stem cell therapies for the management of autism spectrum disorders: a focus on human studies. *Pharmacol Res* [Internet]. 2020;152(Sept 2019):104579. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104579>.
3. Packer A. Neocortical neurogenesis and the etiology of autism spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2016;64:185–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.002>.
4. Ng QX, Loke W, Venkatanarayanan N, Lim DY, Soh AY Sen, Yeo WS. A systematic review of the role of prebiotics and probiotics in autism spectrum disorders. *Medicina*. 2019;55(5):E129.
5. Navarro F, Liu Y, Rhoads JM. Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders? *World J Gastroenterol*. 2016;22(46):10093-102.
6. Critchfield JW, Van Hemert S, Ash M, Mulder L, Ashwood P. The potential role of probiotics in the management of childhood autism spectrum disorders. *Gastroenterol Res Pract*. 2011;2011:161358.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CLINICAL AND BIOMEDICAL RESEARCH (CBR)

Instruções aos Autores

Escopo e política

A Clinical and Biomedical Research (CBR), antiga Revista HCPA, é uma publicação científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). É um periódico científico de acesso livre que tem a finalidade de publicar trabalhos de todas as áreas relevantes das Ciências da Saúde, incluindo pesquisa clínica e básica. Os critérios de seleção para publicação incluem: originalidade, relevância do tema, qualidade metodológica e adequação às normas editoriais da revista.

A CBR apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) [<http://www.who.int/ictip/en/>] e do *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) [http://www.icmje.org/clin_trial.pdf]. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido número de identificação do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) <http://www.ensaiosclinicos.gov.br> ou de outro banco de dados oficial dedicados ao registro de ensaios clínicos.

Todos os artigos publicados são revisados por pares anônimos. Uma vez que o artigo seja aceito para publicação, os seus direitos autorais são automaticamente transferidos para a revista. O conteúdo do material enviado para publicação na CBR implica que o mesmo não tenha sido publicado e não esteja submetido a outra revista. Artigos publicados na CBR, para serem publicados em outras revistas, ainda que parcialmente, necessitarão de aprovação por escrito dos editores. Os conceitos e declarações contidos nos trabalhos são de total responsabilidade dos autores. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. As submissões em inglês são fortemente encorajadas pelos editores.

O manuscrito deve enquadrar-se em uma das diferentes categorias de artigos publicados pela revista, conforme a seguir:

Forma e preparação de artigos

SERÃO CONSIDERADOS PARA PUBLICAÇÃO

Editorial

Comentário crítico e aprofundado, preparado a convite dos editores e submetido por pessoa com notório saber sobre o assunto abordado. Os editoriais podem conter até 1000 palavras. Esta seção pode incluir o editorial de apresentação da Revista, assinado pelo Editor, além de editoriais especiais, que compreendem colaborações solicitadas sobre temas atuais ou artigos publicados na Revista.

Artigos de Revisão

Artigos que objetivam sintetizar e avaliar criticamente os conhecimentos disponíveis sobre determinado tema. Devem conter até 6.000 palavras. Esses artigos devem apresentar resumo, não estruturado com número não superior a 200 palavras (exceto revisões sistemáticas – ver estrutura de resumo em 'Artigos Originais') e uma lista abrangente, mas preferencialmente não superior a 80 referências.

Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

Artigos Especiais

Manuscritos exclusivamente solicitados pelos editores, sobre tema de relevância científica, a autores com reconhecida expertise na área e que não se enquadrem nos critérios de Editorial.

Artigos Originais

Artigos com resultados inéditos de pesquisa, constituindo trabalhos completos que contêm todas as informações relevantes que o leitor possa avaliar seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A sua estrutura de texto deve apresentar os tópicos: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão. A(s) conclusão(ões) deve(m) estar no último parágrafo da Discussão, não sendo necessária uma seção específica. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser apontadas. Para os artigos originais, deve-se apresentar um resumo estruturado (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões), caso o artigo for escrito no idioma português, deverá apresentar também o resumo e título em inglês. O Resumo e o Abstract não devem exceder 250 palavras.

Os artigos submetidos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras. Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documentos suplementares em arquivos individuais.

Relatos de Caso

São artigos baseados em casos peculiares e comentários sucintos sobre a importância do caso em relação ao conhecimento atual na área. Devem conter até 1.000 palavras, com um total de, no máximo, duas tabelas ou figuras e 15 referências, já que o objetivo dos relatos não é apresentar uma revisão bibliográfica.

A sua estrutura deve apresentar os seguintes tópicos: Introdução, explicando a relevância do caso; Apresentação do caso (Relato do Caso) e Discussão. Os relatos de casos devem descrever achados novos ou pouco usuais, ou oferecer novas percepções sobre um problema estabelecido. O conteúdo deve

limitar-se a fatos pertinentes aos casos. O sigilo em relação à identificação dos pacientes é fundamental, não devendo ser relatadas datas precisas, iniciais ou qualquer outra informação não relevante ao caso, mas que eventualmente possa identificar o paciente. Os Relatos de Caso devem ter Resumo não estruturado com no máximo 150 palavras.

Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documentos suplementares em arquivos individuais.

Relatos de Casos: Imagens em Medicina

Seção destinada à publicação de Imagens elucidativas, não usuais e/ou de amplo interesse de situações médicas. Deve conter até 500 palavras e um total de cinco referências. Duas a três imagens (resolução mínima de 300 dpi).

Cartas

Opiniões e comentários sobre artigo publicado na Revista, sobre temas de relevância científica e/ou observações clínicas preliminares. O texto deve ser breve com, no máximo, 500 palavras. Apenas uma tabela e uma figura são permitidas e, no máximo, cinco referências. Não devem ter resumo.

Comunicações Breves

Comunicações breves são resultados preliminares de pesquisas originais ou estudos mais pontuais que contêm todas as informações relevantes para que o leitor possa avaliar os seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A estrutura é semelhante a artigos originais; no entanto, o resumo (Português, Espanhol, ou Inglês) não deve exceder 150 palavras e o texto não deve exceder 1.200 palavras. Ter no máximo duas Tabelas ou Figuras.

Suplementos

Além dos números regulares, a CBR publica o suplemento da Semana Científica do HCPA.

CONFLITOS DE INTERESSE

Conflitos de interesse surgem quando o autor tem relações pessoais ou financeiras que influenciam seu julgamento. Estas relações podem criar tendências favoráveis ou desfavoráveis a um trabalho e prejudicar a objetividade da análise. Os autores devem informar sobre possíveis conflitos de interesse na ocasião do envio do manuscrito. Cabe ao editor decidir se esta informação deve ou não ser publicada e usá-la para tomar decisões editoriais. Uma forma comum de conflito de interesse é o financiamento de trabalhos de pesquisa por terceiros, que podem ser empresas, órgãos públicos ou outros. Esta obrigação para com a entidade financiadora pode levar o pesquisador a obter resultados que a satisfaçam, tornando

o estudo tendencioso. Autores devem descrever a interferência do financiador em qualquer etapa do estudo, bem como a forma de financiamento e o tipo de relacionamento estabelecido entre patrocinador e autor. Os autores podem optar por informar nomes de pareceristas para os quais seu artigo não deva ser enviado, justificando-se.

PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE

Informações e Imagens de pacientes que permitam sua identificação só devem ser publicadas com autorização formal e por escrito do paciente, e apenas quando necessárias ao objetivo do estudo. Para a autorização formal, o paciente deve conhecer o conteúdo do artigo e ter ciência de que este artigo poderá ser disponibilizado na internet. Em caso de dúvida sobre a possibilidade de identificação de um paciente, como fotos com tarjas sobre os olhos, deve ser obtida a autorização formal. No caso de distorção de dados para evitar identificação, autores e editores devem assegurar-se de que tais distorções não comprometam os resultados do estudo.

EXPERIÊNCIAS COM SERES HUMANOS E ANIMAIS

Toda matéria relacionada com pesquisa em seres humanos e pesquisa em animais deve ter aprovação prévia de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), respectivamente. Os trabalhos deverão estar de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque (vigente ou atualizada), das Resoluções CNS 466/2012 e complementares e da Lei 11.794/2008 para estudos em animais. É importante indicar o número do registro do projeto no respectivo Comitê ou Comissão de Ética, bem como da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), se aplicável.

PREPARO DO ARTIGO

O cadastro no sistema como autor e posterior acesso com login e senha são obrigatórios para submissão e verificação do estágio das submissões.

Identificação: devem constar: a) Título do artigo, claro e conciso. Não usar abreviaturas. Título reduzido para constar no cabeçalho e título no idioma inglês; b) Nome completo dos autores; c) Afiliação dos autores com a indicação da instituição e a unidade de vínculo (títulos pessoais e cargos ocupados não deverão ser indicados); d) Indicação do autor correspondente, acompanhada do endereço institucional completo; e) Trabalho apresentado em reunião científica, indicar o nome do evento, o local e a data da realização.

OS NOMES DE TODOS OS AUTORES DO MANUSCRITO DEVEM SER INDICADOS NO SISTEMA COM OS RESPECTIVOS ENDEREÇOS ELETRÔNICOS.

Resumo e Palavras-chave: os artigos devem conter o resumo em português e em inglês. Verificar a estrutura e o número máximo de palavras conforme descrito para cada tipo de artigo específico (ver anteriormente). Os resumos estruturados, exigidos apenas para os artigos originais, devem apresentar, no início de cada parágrafo, o nome das subdivisões que compõem a estrutura formal do artigo (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões). As palavras-chave, expressões que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de 3 a 10, fornecidas pelo autor, baseando-se no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) publicado pela Bireme, que é uma tradução do MeSH (*Medical Subject Headings*) da *National Library of Medicine*, disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>. As palavras-chave devem ser apresentadas em português e em inglês.

Manuscrito: deverá obedecer à estrutura exigida para cada categoria de artigo. Citações no texto e as referências citadas nas legendas das tabelas e das figuras devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto, com algarismos arábicos.

As referências devem ser citadas no texto sobrescritas, conforme o exemplo: Texto¹. texto¹⁻³, texto^{4,6,9}.

Tabelas: devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e encabeçadas por um título apropriado. Devem ser citadas no texto, mas deve-se evitar a duplicação de informação. As tabelas, com seus títulos e rodapés, devem ser autoexplicativas. As abreviações devem ser especificadas como nota de rodapé sem indicação numérica. As demais notas de rodapé deverão ser feitas em algarismos arábicos e sobrescritas.

Figuras e gráficos: as ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, etc.) devem ser enviadas em arquivos separados, em formato JPG (em alta resolução – no mínimo, 300 dpi). Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e serem suficientemente claras para permitir sua reprodução e estarem no mesmo idioma do texto. Não serão aceitas fotocópias. Se houver figuras extraídas de outros trabalhos previamente publicados, os autores devem providenciar a permissão, por escrito, para a sua reprodução. Esta autorização deve acompanhar os manuscritos submetidos à publicação. As figuras devem possuir um título e legenda (se necessário). Ambos devem preceder a figura propriamente dita.

Abreviações: as abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. No restante do artigo, não é necessário repetir o nome por extenso.

Nome de medicamentos: deve-se usar o nome genérico.

Havendo citação de aparelhos/equipamentos: todos os aparelhos/equipamentos citados devem incluir modelo, nome do fabricante, estado e país de fabricação.

Agradecimentos: devem incluir a colaboração de pessoas, grupos ou instituições que tenham colaborado para a realização do estudo, mas cuja contribuição não justifique suas inclusões como autores; neste item devem ser incluídos também os agradecimentos por apoio financeiro, auxílio técnico, etc. Devem vir antes das referências bibliográficas.

Conflitos de interesse: Caso haja algum conflito de interesse (ver anteriormente) o mesmo deve ser declarado. Caso não haja, colocar nesta seção: "Os autores declaram não haver conflito de interesse"

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na mesma ordem em que foram citadas no texto e identificadas com algarismos arábicos. A apresentação deverá estar baseada no formato denominado "Vancouver Style", conforme exemplos abaixo, e os títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela *List of Journal Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine* e disponibilizados no endereço: <ftp://nlpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljweb.pdf>. Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências e apenas citados no texto. Caso entendam necessário, os editores podem solicitar a apresentação de trabalhos não publicados citados no manuscrito.

Exemplos de citação de referências:

Artigos de periódicos (de um até seis autores)

Almeida OP. Autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? Rev Bras Psiquiatr. 1998;20:113-6.

Artigos de periódicos (mais de seis autores)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Höker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. N Engl J Med. 1986;315:157-61.

Artigos sem nome do autor

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J. 1994;84:15.

Livros no todo

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Capítulos de livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Livros em que editores (organizadores) são autores

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Teses

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Trabalhos apresentados em congressos

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland;1992. p. 1561-5.

Artigo de periódico em formato eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from: URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Outros tipos de referência deverão seguir o documento

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Requisitos técnicos

Arquivo word (doc ou .rtf), digitado em espaço duplo, fonte tamanho 12, margem de 2 cm de cada lado, página de título, resumo e descritores, texto, agradecimentos, referências, tabelas e legendas e as imagens enviadas em formato jpg ou tiff com resolução mínima de 300dpi.