

ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE
VITÓRIA – EMESCAM

GUILHERME PASTRO CREIMER
LETÍCIA GUIMARÃES SANTOS
LORRANA ALVES MATOS

**MICROBIOTA INTESTINAL E A INFLUÊNCIA SOB OS SINTOMAS DO
AUTISMO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ENSAIOS CLÍNICOS**

VITÓRIA
2022

GUILHERME PASTRO CREIMER
LETÍCIA GUIMARÃES SANTOS
LORRANA ALVES MATOS

**MICROBIOTA INTESTINAL E A INFLUÊNCIA SOB OS SINTOMAS DO
AUTISMO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ENSAIOS CLÍNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de
Misericórdia de Vitória – EMESCAM, como
requisito parcial para obtenção do grau de
médico.

Orientador: Rodrigo Moraes
Co-orientadora: Maria das Graças Silva
Mattede

VITÓRIA
2022

GUILHERME PASTRO CREIMER
LETÍCIA GUIMARÃES SANTOS
LORRANA ALVES MATOS

**MICROBIOTA INTESTINAL E A INFLUÊNCIA SOB OS SINTOMAS DO
AUTISMO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DE ENSAIOS CLÍNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM, como requisito parcial para obtenção do grau de médico.

Aprovado em _____ de _____ de 20____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Rodrigo Moraes
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de
Misericórdia de Vitória – EMESCAM
ORIENTADOR

Prof^ª. Paula Campos Perim
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de
Misericórdia de Vitória – EMESCAM
AVALIADORA

Prof^ª. Maria das Graças Silva Mattede
Escola Superior de Ciências da Santa Casa de
Misericórdia de Vitória – EMESCAM
CO- ORIENTADORA E AVALIADORA

Dedicamos este trabalho às nossas famílias.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deus, que nos deu força de vontade, determinação, coragem e oportunidade para redigir esse estudo.

Aos nossos pais e familiares pelo incentivo, apoio e compreensão.

Ao professor Rodrigo Moraes, nosso orientador, que durante esse tempo nos acompanhou e nos apoiou, dando o auxílio necessário para elaboração desse projeto.

À professora Maria das Graças Silva Mattede, nossa co-orientadora por todo carinho e atenção durante o desenvolvimento e finalização desse estudo.

À professora Lúcia Helena Pimassoni pelo apoio na análise e interpretação dos dados estatísticos.

À toda equipe docente do curso de Medicina EMESCAM que, através dos seus ensinamentos, nos permitiram concluir essa etapa de nossas vidas e foram essenciais em nossa formação.

Aos nossos amigos por todo apoio.

Agradecemos também a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse estudo.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes.”
Sir Issac Newton

RESUMO

Objetivo: Avaliar se intervenções aplicadas em microbiotas intestinais de indivíduos portadores de transtorno do espectro autista apresentam associação positiva ou negativa para melhorias em relação a duas frentes sintomáticas estudadas: gastrointestinais e neurocomportamentais. **Método:** Estudo descritivo de revisão de literatura sistemática nas bases de dados do *PubMed*, *Medline* e *Cochrane* no período de 6 anos, onde foram encontrados 60 artigos, obtidos pelas seguintes palavras-chave: *Autism and Microbiota*. Após a exclusão de 51 destes, foram analisados nove em sua totalidade. Foram considerados positivos os trabalhos que apresentaram um valor-p associativo em relação aos sintomas $<0,05$. **Resultado e Discussão:** Dos nove trabalhos, 77,7% demonstraram associação duplamente positiva e 22,2% apresentaram associação positiva apenas em uma das frentes. As intervenções que tiveram maior relevância estatística, com $p<0,001$ para ambos os sintomas foram os que fizeram a terapia de Transplante de microbiota fecal. Em sequência, a ordem de relevância se dá pelos estudos feitos com pré e probióticos em terapia combinada, prébióticos com dieta e por último probióticos isolados e com ocitocina. Na análise da significância estatística através da combinação de valores de p de todos os estudos, foi percebido que 100% das interferências apresentaram considerável relevância, com valores de $p<0,0001$ para ambos os sintomas. **Conclusão:** A análise sugere existir associação entre a utilização de intervenções na microbiota intestinal e a diminuição sintomática nas frentes estudadas para pacientes portadores da síndrome.

Palavras-Chave: Autismo. Microbiota.

ABSTRACT

Objective: Evaluate whether interventions applied to the intestinal microbiota of individuals with autism spectrum disorder present a positive or negative association with improvements in relation to two symptomatic fronts studied: gastrointestinal and neurobehavioral. **Method:** Descriptive study of systematic literature review in *PubMed*, *Medline* and *Cochrane* databases over a period of 6 years, where 60 articles were found, obtained from the following keywords: Autism and Microbiota. After excluding 51 of these, nine were analyzed in their entirety. Studies that presented an associative p-value for symptoms <0.05 were considered positive. **Results and Discussion:** Out of the nine studies, 77,7% showed a doubly positive association and 22,2% showed a positive association only on one of the fronts. The interventions that had the greatest statistical relevance, with $p < 0.001$ for both symptoms were those who underwent fecal microbiota transplant therapy. In sequence, the order of relevance is given by the studies carried out with prebiotics and probiotics in combination therapy, prebiotics with diet and finally isolated probiotics and oxytocin. In the analysis of statistical significance through the combination of p values from all studies, it was noticed that 100% of the interferences showed considerable relevance, with p values < 0.0001 for both symptoms. **Conclusion:** The analysis suggests that there is an association between the use of interventions in the intestinal microbiota and the symptomatic decrease from the studied fronts for patients with the syndrome.

Keywords: Autism. Microbiota.

LISTA DE FIGURA

Figura 1- Prisma 2020 Flow Diagram	17
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Quadro de análises comparativas das pesquisas selecionadas para o estudo sobre TEA e Microbiota intestinal.	23
Quadro 2- Relação de título, revista, ano de publicação dos estudos e nome dos autores.	25

LISTA DE SIGLAS

AC - Associação Comportamental

ADOS-G - Autism Diagnostic Observation Schedule Generic

AG - Associação Gastrintestinal

B-GOS® - Bimuno® galacto-oligossacarídeo

CARS - Childhood Autism Rating Scale

DSM-V - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

GABA - Ácido gama-aminobutírico

M-CHAT - Modified Checklist for Autism in Toddlers

TEA - Transtorno do Espectro Autista

TMF - Transplante de Microbiota Fecal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
1.2	JUSTIFICATIVA:.....	15
2	METODOLOGIA	16
2.1	Critérios de Inclusão.....	16
2.2	Critérios de Exclusão.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
4	RESULTADOS	21
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Os transtornos do espectro autista (TEAs) são distúrbios de origem neuropsiquiátrica, marcados por alterações do comportamento percebidas e diagnosticadas geralmente na primeira infância e idealmente antes dos dois anos de idade. A atenção quanto aos sinais e sintomas é imprescindível uma vez que se trata de uma condição sem cura e a intervenção precoce auxilia no manejo do quadro clínico.¹

Essas alterações afetam diretamente a interação social e isso se dá pelo padrão restritivo relacionado à clínica com movimentos repetitivos e estereotipados, desvio de interesses sociais e dificuldade na verbalização. Há assim, uma perda significativa em relação à comunicação social em diferentes marcos da vida, desde a primeira infância até a vida adulta.²

Nos últimos anos, é notável o aumento exponencial do diagnóstico do TEA. Nos Estados Unidos, o número de casos aumentou drasticamente, sendo a estatística de 1 a cada 150 crianças em 2002 para 1 a cada 68 crianças em 2012.³ A justificativa disso não é somente pelo fato dos critérios diagnósticos terem sido melhores definidos, mas também, pelo maior entendimento da doença e suas características, pautado sempre na prerrogativa de que atualmente o diagnóstico é essencialmente clínico.⁴

No entanto, apesar de existirem ferramentas bem documentadas e uma linha de raciocínio mais direta para os casos suspeitos, a etiologia da doença ainda é obscura. Existem, porém, fatores estimulantes a essa busca, como a genética e o ambiente. Assim, por mais que suas causas ainda sejam mal compreendidas, esses fatores estão sendo cada vez mais estudados e seus resultados são animadores.⁵ Diante desses avanços, uma das frentes mais promissoras nessa busca são os estudos do aparelho gastrointestinal, o eixo intestino-cérebro e, assim, sua relação com a microbiota intestinal.

O intestino humano é colonizado por aproximadamente 300 trilhões de micro-organismos⁵ na qual, em um indivíduo saudável, vivem em simbiose e são essenciais para a vida humana.⁶ Esse conjunto é chamado de microbiota intestinal e devido sua importância é a proposta para o tratamento de diversas doenças e, portanto, bastante estudada em diferentes áreas.⁷

Recentes descobertas dizem a favor de que cada indivíduo apresenta uma microbiota única, ou seja, cada qual apresenta seu próprio universo de micro-organismos e este difere-se de pessoa para pessoa.⁸ Estas particularidades levantam diversas hipóteses sobre como a nossa microbiota

intestinal individualizada pode afetar o funcionamento de nosso organismo, tanto para seu benefício, quanto para malefício.

Sabe-se que o eixo intestino-cérebro modula e interage na sintomatologia de diversas doenças neurológicas, entre elas o TEA. Essa relação é muito significativa quando se verifica que a microbiota tem diversos papéis a ela relacionadas, como: regular a permeabilidade da barreira intestinal; agir na produção de neurotransmissores; modular níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro permitindo assim, produção de neurônios e formação de novas sinapses; agir na modulação do nervo vago e no sistema nervoso entérico. Diante disso, o cérebro destaca seu papel, auxiliando a regulação do peristaltismo intestinal, assim como as funções sensoriais e secretoras.⁹

Com a relação do binômio intestino-cérebro bem definida, percebeu-se então que terapêuticas que agem nessa via, podem não apenas melhorar os sintomas gastrointestinais crônicos, como também a gravidade dos sintomas do TEA. Os investimentos nessa frente são tanto para a busca de suas causas, como para seu possível tratamento ou profilaxia. Tendo, portanto, uma relevância e ligação direta com o mapeamento da microbiota intestinal, uso de pré e probióticos e TMF.¹⁰

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar as intervenções aplicadas na microbiota intestinal de indivíduos portadores de TEA a fim de verificar uma associação positiva ou negativa das mesmas a partir de seus respectivos resultados.

1.1.2 Objetivos específicos

Investigar relação entre alterações da microbiota intestinal e sintomas relacionados ao comportamento autista;

Avaliar a associação entre intervenções na microbiota intestinal e melhora dos sintomas gastrointestinais de pacientes portadores do TEA;

Avaliar a associação entre intervenções na microbiota intestinal e melhora dos sintomas relacionados ao comportamento autista;

Determinar, em ordem de relevância, intervenções que apresentem resultados favoráveis quanto à melhora dos sintomas gastrointestinais e do comportamento autista.

1.2 JUSTIFICATIVA:

O número de crianças diagnosticadas com TEA tem aumentado nos últimos anos.³ A justificativa para tal aumento se dá principalmente pelo desenvolvimento de melhores métodos e escores diagnósticos. Associado, pode-se justificar que o maior número de estudos e, portanto, entendimento do transtorno, também auxiliam na busca desse diagnóstico. Porém, com a ocorrência de novos estudos, tornaram-se notórios outros fatores que possam estar ligados à síndrome que justifiquem o aumento dos casos. Entre estes, destaca-se os ambientais, englobando assim, as manifestações intestinais, o que torna questionável a influência do sistema gastrointestinal no transtorno. Porém, ainda existem poucos estudos que comprovem ou façam relação entre alterações gastrintestinais e manifestações do TEA. Dessa forma, a revisão sistemática é uma ferramenta eficiente no intuito de agrupar os estudos realizados e obter uma resposta final dos achados, a fim de justificar ou não a relação desses fatores com o TEA e, conseqüentemente, colaborar para o entendimento geral da síndrome e possíveis intervenções perante a mesma.

2 METODOLOGIA

Estudo observacional, descritivo de revisão sistemática sobre ensaios clínicos com o objetivo de analisar intervenções praticadas na microbiota que possam impactar e justificar alterações clínicas de pacientes portadores de TEA.

Para isso, foram utilizados os seguintes descritores: “*Autism*” and “*Microbiota*” nas bases de dados *PubMed*, *Medline* e *Cochrane*, no espaço temporal de 2014 a 2021, escritos em língua inglesa e somente artigos referentes a ensaios clínicos. Os artigos encontrados foram selecionados após a análise dos títulos e posteriormente dos resumos. Por fim, os artigos remanescentes ao final dessas análises preliminares foram estudados em sua totalidade.

A partir dos dados obtidos nos estudos foi realizada análise estatística. Por meio do teste de *Fisher* utilizando o programa *Bioestat* versão 5.3 foi calculado o valor-p combinado. Os valores de p colocados nos artigos como $< 0,05$ foram considerados como o ponto médio, ou seja, $p = 0,025$ para permitir a realização da análise.

2.1 Critérios de Inclusão

- Trabalhos que contemplam o tema Microbiota e Autismo;
- Pesquisas sobre TEA realizadas por meio de ensaios clínicos.

2.2 Critérios de Exclusão

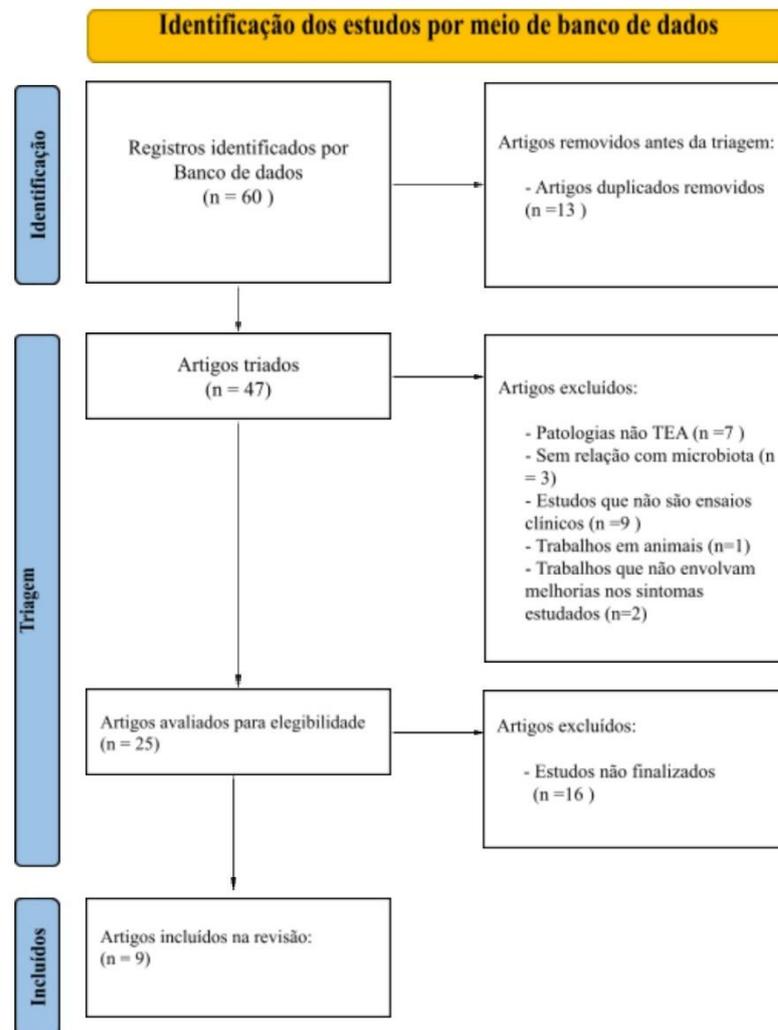
Foram excluídos trabalhos com as seguintes características:

- Em outras línguas que não sejam o inglês;
- Não abordam o tema microbiota e autismo;
- Não sejam ensaios clínicos sobre TEA;
- Publicados fora do intervalo temporal de 2014-2021;
- Não englobaram abordagem sobre melhorias dos sintomas gastrointestinais e comportamentais do TEA.
- Trabalhos com animais;
- Incompletos;
- Duplicatas.

De acordo com o fluxograma de Prisma (Figura 1), na busca inicial foram encontrados 60 artigos relacionados ao tema de acordo com os termos de busca. Destes, 13 foram excluídos por

estarem duplicados, restando 47, nos quais foram analisados a partir dos seus títulos e resumos. Dos mesmos, foram excluídos 22, totalizando assim 25 trabalhos a serem estudados. Todos os artigos foram estudados em sua plenitude, no entanto, apenas nove faziam referência ao objetivo do estudo com trabalhos concluídos na íntegra, portanto, 16 não condizentes foram descartados.

Figura 1- Prisma 2020 Flow Diagram



Fonte: Prisma 2020 Flow Diagram adaptado pelos autores, 2022.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O Transtorno do Espectro Autista

O TEA é um distúrbio de caráter neurológico complexo que interfere diretamente na vida social e pessoal dos indivíduos portadores. Apesar dos números crescentes em todo o mundo, sua etiologia ainda é questionada, mas sabe-se que envolve não só fatores genéticos, como também uma forte associação com fatores ambientais.¹¹ Este último corresponde a uma das principais vertentes de estudos atualmente, destacando além dos fatores mais conhecidos, como: prematuridade, exposição a certos medicamentos no pré-natal, idade avançada dos pais¹², as alterações na microbiota intestinal, como a disbiose.

Observando apenas a sintomatologia, é um distúrbio bastante variado, apresentando quadros com formas mais brandas, sem muito comprometimento na vida diária e cognitiva. No entanto, ocorrem formas mais críticas, englobando indivíduos portadores de deficiência intelectual grave e com déficit interativo-social considerável.

De acordo com o DSM-V, os sintomas baseiam-se em déficit da comunicação e interação social, além de padrões repetitivos e restritivos de comportamento³ que não são explicados por atrasos no desenvolvimento ou deficiência intelectual. Os pacientes com o transtorno apresentam dificuldade na verbalização, atrasos na fala, movimentos estereotipados e emissão de sons sem motivo aparente, evitam contato visual, têm dificuldades em relação à mudança de rotina e são em geral mais isolados.

Entretanto, novas vertentes têm sido estudadas em relação à sintomatologia da doença, entre essas, foi notado que esses pacientes possuem sintomas gastrointestinais mais proeminentes que os demais, destacando-se: distensão abdominal, flatulência, diarreia e constipação.¹¹ Além disso, os portadores também possuem alterações em seus hábitos alimentares, como seletividade, recusa e até aversão. Verificou-se que esses pacientes, em geral, possuem uma disbiose significativa e, portanto, alterações na microbiota intestinal capazes não só de gerar sintomas intestinais, como de exacerbar os sintomas comportamentais, aumentando a irritabilidade, distúrbios do sono, raiva e até agressividade.³

Os primeiros sinais e sintomas são normalmente percebidos na primeira infância e idealmente diagnosticados a partir dos dois anos de idade. A criança deve ser acompanhada nas consultas

de puericultura, realizando assim, anamnese detalhada sobre seus comportamentos diários, história familiar, fatores de risco, entre outros. Auxiliando o diagnóstico, o exame físico deve ser pautado na linguagem verbal, foco do olhar, movimentos estereotipados, expressões faciais, assim como alterações neurológicas e audiológicas. Caso seja encontrado anormalidades no desenvolvimento neuropsicomotor e excluindo outras causas, as ferramentas de *screening* para autismo devem ser utilizadas.

As escalas em questão, fundamentam-se principalmente nos critérios do DSM-IV e DSM-V. Essas, podem ser tanto baseadas na entrevista com familiares quanto focadas no comportamento da criança. Dentre as várias existentes, destaca-se o M-CHAT (*Modified Checklist for Autism in Toddlers*), ferramenta muito utilizada na prática, pois não necessita de treinamento e não demanda muito tempo para ser aplicada. É utilizado em crianças de 16 e 30 meses, porém, tem alta taxa de falsos positivos. O *Childhood Autism Rating Scale* (CARS) é uma escala que avalia 15 itens sobre os domínios principais das crianças percebidos pelos pais e permite a distinção de autismo leve, moderado e grave, além de poder ser aplicado em crianças de todas as idades. Por fim, o ADOS-G (*Autism Diagnostic Observation Schedule Generic*) é uma ferramenta de avaliação dos domínios afetados no TEA através da aplicação de tarefas. Este possui maior sensibilidade e especificidade, mas nem todos os profissionais estão habilitados para sua utilização.³ A escolha da técnica precisa estar pautada na capacidade do médico, bem como na estrutura mínima para aplicá-la.

O tratamento desse transtorno é baseado na ação de uma equipe multidisciplinar, onde o pediatra tem papel primordial no diagnóstico e seguimento desses pacientes. Alguns programas terapêuticos utilizam técnicas para auxiliar o estímulo de habilidades sociais e comunicativas. Outros são voltados para o campo educacional, além do tratamento medicamentoso para os sintomas mais proeminentes, bem como o auxílio fonoaudiológico, nutricional e psicológico. Porém, nenhuma dessas intervenções é comprovadamente eficaz/curativa nos sintomas centrais do TEA. Entretanto, devido aos sintomas gastrointestinais exuberantes e sua possível relação com os sintomas comportamentais, muitos estudos em relação a composição e alterações na microbiota intestinal tem auxiliado no manejo terapêutico, entre estas: uso de probióticos, prebióticos e TMF.

A Microbiota Intestinal

O intestino possui trilhões de bactérias que vivem em simbiose, sendo a maioria benéfica ao corpo por auxiliar em sua homeostase e proteger contra bactérias possivelmente patogênicas. Entretanto, sabe-se que a microbiota intestinal não apresenta apenas ação sob a mucosa entérica, tendo em vista a existência de um vínculo direto com o sistema nervoso.¹³ A relação dessas alterações gastrointestinais e doenças com comprometimento neurológico como Alzheimer, Parkinson, TEA, impulsionaram pesquisas sobre como esses sistemas se relacionam e, assim, foi destacada a via microbiota-intestino-cérebro.

Essa relação ocorre direta ou indiretamente devido a ação dos micro-organismos na produção de neurotransmissores, ácidos graxos, aminoácidos e no auxílio da ativação do sistema imunológico. Além de alterar a permeabilidade intestinal, a microbiota modula os níveis circulantes de proteínas que regulam a atividade neuronal, modifica atividades aferentes do nervo vago, sistema nervoso entérico e neuroendócrino. O cérebro responde então através do sistema nervoso parassimpático com o peristaltismo intestinal e função sensorial. Com isso, há nítida relação entre alterações na microbiota e como essas podem causar distúrbios nesse eixo e vice-versa.⁹

Perante o TEA, vários estudos mostram disbiose na microbiota em relação a composição, equilíbrio, diversidade, mudança estrutural e alteração do perfil metabólico. Em alguns pacientes foi observado a diminuição de bactérias possivelmente benéficas como *Bifidobacterium* spp. e *Akkermansia* spp. e predomínio de bactérias do gênero *Clostridium* spp. potencialmente patogênicas.¹⁴ Além disso, há correlação da disbiose com prejuízo na permeabilidade e integridade da barreira intestinal, sendo encontrado maior número de linfócitos e citocinas pró-inflamatórias que causam danos epiteliais. Outro estudo com perfis metabólicos em amostra de fezes, mostrou que nesses pacientes há maior concentração de glutamato, um neurotransmissor excitatório que se relaciona com o Ácido gama-aminobutírico (GABA), gerando assim, aumento da neuroinflamação ligada ao processo sensorial. Já a glutatona, um metabólito essencial para desintoxicação, apresenta relação da sua forma reduzida e oxidada alterada em indivíduos com TEA.¹⁵

4 RESULTADOS

Foram encontrados 60 artigos nas bases de dados *PubMed*, *Medline* e *Cochrane*, no espaço temporal de 2014 a 2021 e após a aplicação dos critérios de exclusão, foram analisados nove artigos. Destes, sete (77,7%) apresentam associação duplamente positiva entre as intervenções aplicadas na microbiota intestinal e os sintomas gastrointestinais (diarreia, constipação, flatulência, dor abdominal, entre outros) assim como para os sintomas comportamentais (irritabilidade, discurso inapropriado, estereotípias, entre outros). Quatro desses, desenvolveram seus respectivos estudos por meio da aplicação de terapias: a) conjunta de probióticos e prebióticos, b) isolada com probióticos, c) prébióticos com dieta, além de mais três artigos que realizaram TMF.

Nos outros dois artigos restantes (22,2%) foram realizadas intervenções através do uso de probióticos em Arnold et al.¹⁶ e probióticos e ocitocina em Kong et al.¹⁷ onde ambos não observaram associação duplamente positiva entre os sintomas estudados. No artigo de Arnold et al.¹⁶ contemplou melhora apenas nos sintomas gastrointestinais enquanto no Kong et al.¹⁷ apresentou melhora somente nos sintomas comportamentais.

Em relação ao uso dos probióticos, foi notada uma semelhança quanto à sua composição, na qual em todos os estudos em que essa terapêutica foi aplicada, foram encontrados *Bifidobacterium infantis* em suas formulações. Também como destaque, o *Lactobacillus plantarum* teve grande prevalência, presente em quatro de cinco artigos nos quais essa intervenção foi utilizada, exceto no estudo de Wang et al.¹⁸ em que se utilizou outros tipos de *Lactobacillus*, como o *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*. As demais composições bacterianas dos probióticos contaram com outros gêneros de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., porém, destaca-se os estudos de Santocchi et al.⁹ e Arnold et al.¹⁶ que foram os únicos a utilizarem de *Streptococcus thermophilus*.

Os estudos que fizeram intervenções com prebióticos (oligossacarídeos) contemplam 33,3% (3) dos artigos, sendo que em dois deles foram utilizados galacto-oligossacarídeo. No estudo de Sanctuary et al.¹⁴ foi realizada terapia combinada de colostro bovino com probiótico e no Grimaldi et al.¹⁹ foi aplicado primeiro uma dieta de restrição e após, intervenção apenas com o prebiótico. Já em outro estudo, de Wang et al.¹⁸ foi utilizado uma terapia conjunta de probiótico com o prebiótico fruto-oligossacarídeo e este apresentou significativa relevância estatística para ambas frentes sintomáticas.

Os estudos que fizeram terapias associadas, sejam elas com pré e probióticos juntos ou com uso de ocitocina e dieta, representam 44,4% (4) e em sua maioria apresentaram associação positiva, exceto no artigo de Kong et al.¹⁷ em que foi feita intervenção de probióticos com ocitocina e não apresentou melhoras nos sintomas gastrointestinais, porém, com relevâncias nos sintomas comportamentais ($p < 0,05$).

Em relação à composição da microbiota intestinal, quatro ensaios clínicos (44,4%) demonstraram aumento do gênero *Bifidobacterium* spp. pós intervenção, sendo dois ensaios realizados por meio de terapêutica com prebióticos e dois com TMF. Além disso, em outros dois artigos, de Sanctuary et al.¹⁴ e Zhao et al.²⁰ foi observado a relação de *Bacteroides fragilis* em pacientes com TEA e sua diminuição após a terapêutica. Entretanto, houve divergência em relação aos estudos de Grimaldi et al.¹⁹ e Wang et al.¹⁸, pois o primeiro adotou medidas de dieta restritiva e houve aumento do gênero *Clostridium* spp., enquanto no segundo, foi promovida intervenção de probióticos com oligossacarídeos e foi observado diminuição dessas bactérias denominadas patogênicas.

As intervenções que tiveram maior relevância estatística, com $p < 0,001$ tanto para sintomas gastrointestinais quanto para os comportamentais, foram os que fizeram a terapia de TMF, contemplando dois de três artigos associados ao método, demonstrando assim, sua importância para o tratamento desses pacientes. Outros estudos apresentaram da mesma forma um $p < 0,001$, porém, esses valores foram averiguados em somente uma das associações estudadas, como no Wang et al.,¹⁸ sobre o uso de probióticos e prebióticos, com positividade para os sintomas gastrointestinais e no Zhao et al.²⁰, também sobre TMF, nos neurocomportamentais.

Em sequência, a ordem de relevância se dá pelos estudos feitos com terapia combinadas de pré e probióticos, seguidas de prebióticos com dieta e subsequentemente pelo uso de probióticos isolados e com ocitocina.

Na análise da significância estatística através da combinação de valores de p de todos os estudos, foi percebido que 100% das interferências apresentaram considerável relevância, com valores de $p < 0,0001$ para ambos os sintomas, comportamentais e gastrointestinais.

Quadro 1- Quadro de análises comparativas das pesquisas selecionadas para o estudo sobre TEA e Microbiota intestinal.

Autor do ensaio clínico	Associação positiva ou negativa	n	Tratamento utilizado	Valor-p*
Kang et al., 2017.	Associação positiva relacionada a melhorias dos sintomas gastrointestinais e comportamentais.	38	TMF	p< 0,001 (AG) p<0,001 (AC)
Kang et al, 2019	Associação positiva relacionada a melhorias dos sintomas gastrointestinais e comportamentais.	38	TMF	p<0,001 (AG) p<0,001 (AC)
Wang et al, 2020	Associação positiva relacionada a melhorias dos sintomas gastrointestinais e comportamentais.	50	Probiótico (<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.) + Prebiótico (Fruto-oligossacarídeo)	p<0,001 (AG) p<0,009 (AC)
Arnol et al, 2019	Associação positiva para sintomas gastrointestinais sem alteração nos sintomas comportamentais	13	Probiótico (<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp. <i>E Streptococcus</i> spp.)	p<0,02 (AG) p=0,84 (AC)
Sanctuary et al., 2019	Associação positiva relacionada a melhorias dos sintomas gastrointestinais e comportamentais.	8	Prebiótico (Colostro de bovino - galacto - oligossacarídeo) e probiótico (<i>Bifidobacterium infantis</i>)	p<0,05** (AG) p<0,05** (AC)
Grimaldi et al, 2018	Associação positiva relacionada a melhorias dos sintomas gastrointestinais e comportamentais.	30	Prebiótico (galacto-oligossacarídeo) e dieta de restrição	p< 0,05 (AG) p<0,05 (AC)
Kong et al, 2021	Associação positiva para sintomas comportamentais sem alteração de sintomas gastrointestinais	35	Probiótico (<i>Lactobacillus</i> spp.) e ocitocina	p=0,18 (AG) p<0,05 (AC)
Zhao et al, 2019	Associação positiva relacionada a melhorias dos sintomas gastrointestinais e comportamentais.	48	TMF	p<0,05 (AG) p<0,001 (AC)
Santocchi et al, 2020	Associação positiva para sintomas gastrointestinais e comportamentais	85	Probiótico (<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.)	p<0.0191 (AG) p<0,026 (AC)
Valor-p combinado*** p<0,0001				

Fonte: Autoria própria, 2022

* Valor-p: probabilidade de obter-se uma estatística do teste igual ou mais extrema que aquela observada na amostra sob condições de hipótese nula. Valor de p levados em relevância no estudo foram de $p < 0,05$.

** Valores-p diferentes considerados como $p < 0,05$. Os artigos de referência apresentaram diversos valores-p relacionados aos sintomas em questão, porém, desmembrados. No entanto, todos estes apresentam valores-p $< 0,05$, deste modo, no presente artigo, para melhor visualização e entendimento, foi considerado nos mesmos, $p < 0,05$.

*** Valor-p combinado: média ponderada dos valores-p analisados.

Quadro 2- Relação de título, revista, ano de publicação dos estudos e nome dos autores.

Título, Revista, ano	Autores
Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study, Microbiome , 2017	Dae-Wook Kang , James B Adams, Ann C Gregory , Thomas Borody, Lauren Chittick, Alessio Fasano, Alexander Khoruts, Elizabeth Geis, Juan Maldonado , Sharon McDonough-Means, Elena L Pollard, Simon Roux, Michael J Sadowsky, Karen Schwarzberg Lipson, Matthew B Sullivan, J Gregory Caporaso, Rosa Krajmalnik-Brown
Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota, Scientific Reports , 2019	Dae-Wook Kang ,James B. Adams ,Devon M. Coleman ,Elena L. Pollard ,Juan Maldonado ,Sharon McDonough-Means ,J. Gregory Caporaso eRosa Krajmalnik-Brown
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, Pharmacological Research , 2020	Ying Wang, Ning Li, Jun-Jie Yang, Dong-Mei Zhao, Bin Chen, Guo-Qing Zhang, Shuo Chen, Rui-Fang Cao, Han Yu, Chang-Ying Zhao, Lu Zhao, Yong-Sheng Ge, Yi Liu, Le-Hai Zhang, Wei Hu, Lei Zhang, Zhong-Tao Gai
Probiotics for Gastrointestinal Symptoms and Quality of Life in Autism: A Placebo-Controlled Pilot Trial, Journal Of Child and Adolescent Psychopharmacology , 2019	L Eugene Arnold, Ruth Ann Luna, Kent Williams, James Chan, Robert A Parker, Qinglong Wu, Jill A Hollway, Adelina Jeffs, Frances Lu, Daniel L Coury, Caitlin Hayes, Tor Savidge
Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms, Plos One , 2019	Megan R Sanctuary , Jennifer N Kain, Shin Yu Chen, Karen Kalanetra, Danielle G Lemay, Destanie R Rose, Houa T Yang, Daniel J Tancredi, J Bruce Alemão, Carolyn M Slupsky, Paul Ashwood, David A Mills, Jennifer T Smilowitz, Kathleen Angkustsiri
A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs), Microbiome , 2018	Roberta Grimaldi, Glenn R. Gibson, Jelena Vulevic, Natasa Giallourou, Josué L. Castro-Mejía, Lars H. Hansen, E. Leigh Gibson, Dennis S. Nielsen, e Adele Costabile
Probiotic and Oxytocin Combination Therapy in Patients with Autism Spectrum Disorder: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Pilot Trial, Nutrients , 2021	Xue-Jun Kong, Jun Liu , Kevin Liu, Madelyn Koh, Hannah Sherman, Siyu Liu, Ruiyi Tian, Piyawat Sukijthamapan, Jiuju Wang, Michelle Fong, Lei Xu, Cullen Clairmont , Min-Seo Jeong, Alice Li, Maria Lopes, Veronica Hagan, Tess Dutton, 1 Suk-Tak (Phoebe) Chan, Hang Lee, Amy Kendall, Kenneth Kwong, e Yiqing Song
Fecal microbiota transplantation for children with autism spectrum disorder, Gastrointestinal Endoscopy , 2019	Huijun Zhao, Xuefeng Gao, Luo Xi, Yichao Shi, Lihua Peng, Chongying Wang, Liping Zou, Yunsheng Yang
Effects of Probiotic Supplementation on Gastrointestinal, Sensory and Core Symptoms in Autism Spectrum Disorders: a Randomized Controlled Trial, Frontiers in Psychiatry , 2020	Elisa Santocchi, Letizia Guiducci, Margherita Prosperi, Sara Calderoni, Melania Gaggini, Fabio Apicella, Raffaella Tancredi, Lucia Billeci, Paola Mastromarino, Enzo Grossi, Amalia Gastaldelli, Maria Aurora Morales, Filippo Muratori

Fonte: Autoria própria, 2022

5 DISCUSSÃO

Diante da grandeza do assunto, é notória uma ascensão de estudos voltados ao tema nos últimos anos²¹. No entanto, o número de pesquisas relacionadas a ensaios clínicos ainda é pequeno e inovador. Deste modo, de maneira oportuna, voltamos nosso estudo a estes, buscando assim, relacionar de forma prática as mais novas frentes intervencionistas e por conseguinte, seus resultados.

Em nosso artigo, foram analisados nove estudos, todos eles impreterivelmente ensaios clínicos. Nessa revisão, foi almejado basear-se em artigos que tivessem como foco intervenções na microbiota intestinal, buscando assim, melhoria nos sintomas gastrointestinais e sintomas comportamentais em pacientes portadores de autismo, não englobando, portanto, trabalhos que não apresentassem relevância sobre o tema. Vale a pena ressaltar que, dentre esses, um dos artigos de Kang, et al.²² representa a continuação de seu estudo piloto anterior¹¹ também aqui englobado, tendo o mesmo, relevância em diferentes focos de estudo.

Dentre os trabalhos analisados, sete (77,7%) apresentaram associação positiva tanto para os sintomas gastrointestinais estudados, quanto para os sintomas comportamentais relacionados à síndrome, sugerindo dessa forma, associação positiva às intervenções estudadas. Diante da análise estatística dos resultados, aventa-se para ambas as frentes supracitadas o valor-p combinado de $p < 0,0001$, reforçando assim, sua veracidade.

Dessa forma, em frente às pesquisas, foi notada grande euforia por parte da comunidade científica em relação ao trato gastrointestinal e o transtorno, e isso se deu pela observação de um padrão patológico de sintomas gastrointestinais em muitos pacientes com TEA. Associado a esse achado, foi também averiguado, segundo autores, que a gravidade do transtorno está diretamente relacionada aos sintomas gastrointestinais apresentados.^{11, 22}

Perante os estudos, foi constatado particularidades em relação a microbiota intestinal de pacientes com TEA e pacientes sem a doença. Entre elas, foi destacada por estudos de mapeamento intestinal a presença de maior quantidade de bactérias possivelmente patogênicas como o *Clostridium* spp. Em contrapartida, foi notado também uma diminuição de bactérias

possivelmente benéficas como as *Bifidobactérias* spp. e *Akkermansia* spp., somado ao achado de menor diversidade na microbiota geral destes pacientes em comparação com crianças saudáveis.^{18, 19}

Mantendo foco nas intervenções e em como essas se traduziriam em melhorias sintomáticas, destacamos três frentes principais: uso de probióticos, prebióticos e TMF. Assim, devemos pontuar também que em dois desses artigos^{14, 18} foram utilizadas associações entre as intervenções supracitadas, denominadas na presente discussão como “terapia combinada”. Além da sobreposição destes artigos, devemos salientar, também, que não foram englobados de forma primordial outros tipos de intervenções, como: uso de antibióticos prévios, dietas e uso de ocitocina.

Em relação ao uso de probióticos, foi notada uma associação positiva em relação a melhora dos sintomas gastrointestinais em dois de três estudos. Da mesma forma, diante dos sintomas neurocomportamentais, dois de três estudos mostraram melhorias. Em dissonância, um dos três estudos apresentou associação duplamente positiva, este foi o Santocchi et al.⁹, que realizou um estudo duplo-cego randomizado em 85 pré-escolares e avaliou seus resultados pautado no escore ADOS.

Já os prebióticos, apresentaram relação integralmente dupla positiva, no entanto, vale ressaltar que foi estudado somente um artigo isolado sobre o tema, já que no presente estudo há três artigos relacionados a essa intervenção e, em dois dos mesmos, o uso de prebióticos teve sua utilização em associação ao uso de probióticos. O artigo de Grimaldi et al.¹⁹, traz uma abordagem pautada no uso de prebióticos e dietas restritivas. O prebiótico de escolha foi o prebiótico B-GOS® (bimuno® galacto-oligossacarídeo) e a dieta era baseada principalmente na exclusão de glúten e caseína. Seu estudo foi realizado em 30 crianças e sua associação, como anteriormente exposta, foi duplamente positiva.

Como citado anteriormente, dois artigos estudados apresentaram uma forma de terapia combinada entre o uso de prebióticos e probióticos, na qual realizaram essas intervenções de forma conjunta, não diferenciando seus resultados de forma específica. Porém, apesar do exposto, seus resultados são duplamente positivos, apresentando, portanto, 100% de melhorias em ambas associações estudadas.

Em relação ao TMF, podemos afirmar que, diante de nossa pesquisa, foi a metodologia intervencionista mais promissora. Representada por três de nove artigos, apresentou-se em

100% destes resultados favoráveis positivamente para as duas frentes sintomáticas, além de apresentarem em dois dos artigos relevância estatística importante em ambas, com $p < 0,001$. O TMF é um processo realizado por ingestão de cápsulas contendo microbiota fecal filtrada de um doador saudável para um paciente disbiótico. Nesse transplante, é recebido grande quantidade de micróbios comensais, avaliados como benéficos, e sua intenção é a correção da disbiose do receptor.¹¹

Como destaque, o artigo de Kang et al.²² apresenta um estudo com 38 pacientes que foram acompanhados por dois anos desde a publicação de seu artigo piloto. Inicialmente, no primeiro estudo, foram encontradas associações positivas para os dois sintomas e um aumento da quantidade de bactérias ditas como benéficas nos receptores. Com o passar dos dois anos e com o acompanhamento dessas crianças, o segundo artigo foi lançado, e seus resultados continuaram positivos, além de ter sido documentada a permanência dos micro-organismos benéficos. O autor relata a necessidade de mais estudos em uma população maior para concreta validação dos resultados, porém, é fato que os resultados são otimistas.

É sabido também que o TEA é uma síndrome que atualmente acompanha seus portadores de forma permanente²³ e que, diante dessa condição prolongada, os estudos aqui englobados apresentam uma visão limitada sobre os efeitos dessas intervenções a longo prazo, tendo em vista que os estudos em questão realizam acompanhamentos temporários.

De modo geral, a maior parte da literatura publicada sobre a relação/intervenção microbiota e autismo apresenta uma associação positiva quando o desfecho esperado é pautado na melhora sintomática dos pacientes. No entanto, destacamos aqui algumas dificuldades em nossa pesquisa, principalmente relacionados à interposição de métodos terapêuticos, tempo de acompanhamento e tamanho das amostras. Além disso, como já mencionado, grande parte dos estudos são recentes e ainda escassos, principalmente na frente intervencionista onde englobam-se os ensaios clínicos. Essa particularidade impossibilitou não só a análise de mais estudos, como também de outras intervenções terapêuticas. Deste modo, diante do estudo e nossas análises, destacamos que estes resultados devem ser analisados com parcimônia.

6 CONCLUSÃO

Diante da revisão exposta, fica clara a relação do eixo intestino-cérebro e como alterações na microbiota podem impactar em doenças neurológicas como o autismo. Na análise, foi percebida relação entre o predomínio de bactérias classificadas como patogênicas e o agravamento sintomatológico dos pacientes. Dessa forma, foi destacado possibilidades terapêuticas que possam agir na microbiota e melhorar sintomas gastrointestinais e comportamentais. Destas, as que tiveram pertinência em sua respectiva ordem de relevância, foram: TMF, prebióticos e probióticos em terapia combinada, prébióticos com dieta e por último probióticos isolados e com ocitocina, respectivamente. Apesar do tratamento com TMF ter sido destacada como a melhor intervenção terapêutica, demonstrando melhoria expressiva na sintomatologia dos pacientes, a análise geral dos valores de p combinado mostrou relevância estatística significativa para todas as intervenções estudadas.

Deste modo, fica exposta a importância do assunto e sua aplicabilidade clínica. Por conseguinte, traz destaque as melhorias sintomatológicas de uma síndrome estatisticamente relevante em nível mundial. Portanto, é notório a necessidade de incentivos às pesquisas relacionadas ao tema, visando assim, trabalhos mais robustos e resultados que se traduzam em tratamentos efetivos aos pacientes portadores do TEA.

REFERÊNCIAS

1. Gomes PTM., Lima LHL., Bueno MKG, Araújo LA, Souza NM. Autismo no Brasil, desafios familiares e estratégias de superação: revisão sistemática. *Jornal de pediatria*, v. 91, p. 111-121, 2015.
2. Parr J. Autism. *BMJ Clin Evid*. 2010 jan 7; (0322): 1-19.
3. Sociedade Brasileira de Pediatria. Transtorno do espectro do autismo. *Dep Científico de pediatria do desenv e comportamento* 2019; 1-24.
4. Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. *The Lancet*. 2014 Mar 8; 383(9920):896-910.
5. Mughal S, Faizy RM, Saadabadi A. Autism Spectrum Disorder. In: StatPearls [Internet]. 2021 Aug 6. [acesso em 2022 abril 18]; 1-16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525976/>
6. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, et. al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017 Nov 8;81(4) 1-67.
7. Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J*. 2016 May;92(1087):286-300.
8. Salonen, A., de Vos, WM. Impact of Diet on Human Intestinal Microbiota and Health. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2014; 5(1), 239–262.
9. Santocchi E, Guiducci L, Prosperi M, Calderoni S, Gaggini M, Apicella F. et al. Effects of Probiotic Supplementation on Gastrointestinal, Sensory and Core Symptoms in Autism Spectrum Disorders: a Randomized Controlled Trial. *Frontiers in Psychiatry*. 2020 Sep 25; (11) 1-12.
10. Illiano P, Brambilla R, Parolini C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. *FEBS J*. 2020 Mar;287(5):833-855.
11. 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*. 2017;5(10) 1-16

12. Almeida SSA., Mazete BPGS., Brito AR., Vasconcelos MM., Transtorno do Espectro autista. *Residencia Pediátrica. Soc Bras de Pediatria*. 2018; (8) 72-78.
13. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol*. 2015;28(2):203-209.
14. Sanctuary MR, Chen JNKY, Lemay KKDG, Rose DR, Yang HT, Tancredi DJ. et al. Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *Plos One*. 2019 jan 9;14(1) 1-30.
15. Kang DW, Adams JB, Vargason T, M Santiago M, Hahn J, Brown RK. Distinct Fecal and Plasma Metabolites in Children with Autism Spectrum Disorders and Their Modulation after Microbiota Transfer Therapy. *mSphere*. 2020 oct 20; 5(5) 1-17
16. Arnold LE, Luna RA, Williams K, J Chan, Parker RA, Wu O. Probiotics for Gastrointestinal Symptoms and Quality of Life in Autism: A Placebo-Controlled Pilot Trial. *Journal Of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2019; 9(9) 659-669
17. Kong XJ, Liu J, Liu K, Koh M, Sherman H, Liu S. et al. Probiotic and Oxytocin Combination Therapy in Patients with Autism Spectrum Disorder: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Pilot Trial. *Nutrients*. 2021 may 5. 1552(13) 1-17.
18. 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. *Pharmacological Research*. 2020 april 17; 104784 1-13.
19. Grimaldi R, Gibson GR, Vulevic J, Giallourou N, Mejía JLC, Hansen LH. et al. A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome*. 2018; 133(6) 1-13.
20. Zhao H, X Gao X, Xi L, Shi Y, Peng L, Wang C, Zou L, Yang Y. et al. Fecal microbiota transplantation for children with autism spectrum disorder. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2019;89(6s) AB512-513.

21. Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, Faggioli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Microbiota intestinal no autismo e transtornos do humor. *Mundial J Gastroenterol*. 2016;22(1):361-368.
22. Kang DW, Adams JB, Devon M, Coleman MD, Elena L, Pollard EL, Maldonado J, Means SMD, Caporaso JG, Brown RK. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Scientific Reports*. 2019 apr 9; 9(5821) 1-9.
23. Valkanova V, Rhodes F, Allan CL. Diagnosis and management of autism in adults. *Practitioner*. 2013 May;257(1761):13-6, 2-3.