



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE - FACES
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ISABELLA BEZERRA MARQUES

**EVIDÊNCIAS DA RELAÇÃO ENTRE A COLONIZAÇÃO INTESTINAL POR
Clostridium difficile E TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado no formato de artigo científico
ao UniCEUB como requisito parcial para a
conclusão do curso de Bacharelado em
Biomedicina.

Orientadora: Professora Fabiola Fernandes
dos Santos Castro.

Brasília

2016

EVIDÊNCIAS DA RELAÇÃO ENTRE A COLONIZAÇÃO INTESTINAL POR *Clostridium difficile* E TRASTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

Isabella Bezerra Marques¹

Fabiola Fernandes dos Santos Castro²

Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno multifatorial influenciado por fatores genéticos e ambientais. Entre as complicações sofridas pelos autistas estão as desordens gastrointestinais e a deficiência imunológica que permitem a colonização pelo *Clostridium difficile*. Essa bactéria produz toxinas A e B e ácido propiônico. Essas toxinas e o ácido propiônico podem alcançar a circulação sistêmica, devido ao aumento da permeabilidade intestinal. O principal tratamento é o uso da vancomicina, porém seu uso frequente seleciona esporos resistentes. Algumas alternativas de tratamento são o transplante de fezes, o uso de probióticos e prebióticos e a vacinação. Este trabalho tem por objetivo verificar a propensão que o intestino de pacientes autistas tem de ser colonizado por *Clostridium difficile*, com base em uma revisão bibliográfica narrativa realizada com artigos publicados no período de 1997 a 2015.

Palavras-chave: Autismo. Sistema gastrointestinal. Sistema imunológico. Toxinas A e B. Ácido propiônico Tratamentos.

EVIDENCE OF RELATIONSHIP BETWEEN THE INTESTINAL COLONIZATION BY *Clostridium difficile* AND THE AUSTISM SPECTRUM DISORDERS (ASDs)

Abstract

The Austim Spectrum Disorders (ASDs) is a multifactorial disorder that involves both genetic and environmental factors. Among the complications suffered by autistic individuals are gastrointestinal disorders and immune deficiency that allows the colonization by *Clostridium difficile*. This bacterium produces toxins A and B and propionic acid that. These toxins and propionic acid can reach the systemic circulation due to increase of intestinal permeability. The main treatment is the use of vancomycin, although its frequent use can select resistant spores. Some alternative treatments are the fecal microbiota transplantation, the use of probiotics and prebiotics and vaccination. This study aims to determine the propensity that the intestinal of autistic patients must be colonized with *Clostridium difficile*, based on a narrative literature review using articles published from 1997 to 2015.

Key-words: Autism. Toxins A and B. Propionic acid Gastrointestinal system. Immunologic system. Treatments.

¹Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. isabellabezmarques@gmail.com

²Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade de Brasília – UNB. Professora de Biomedicina no Centro Universitário de Brasília. fabiola.castro@uniceub.com

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno de herança complexa, ou seja, é uma doença de caráter genético influenciado por fatores ambientais que acarretam o atraso do desenvolvimento das habilidades sociais, comunicativas e cognitivas, além de interesses e/ou atividades restritas, repetitivas e estereotipadas (CARVALHO et al., 2012). Ao analisar a influência dos fatores genéticos e fatores ambientais, foi observado que essa influência é de 50% para cada fator, podendo apresentar variações no quadro clínico e na sua gravidade (GAZOLA; CAVEIÃO, 2015).

Segundo a primeira triagem feita no genoma para regiões que poderiam estar associadas especificamente ao autismo, haviam aproximadamente 354 marcadores genéticos que estavam sendo associados a oito regiões dos cromossomos 2,4, 7, 10, 13, 15, 16, 19 e 22 e que poderiam possuir influência no desenvolvimento do autismo. Atualmente, pesquisas no âmbito genético apontam que os genes candidatos são aqueles localizados no cromossomo 2, entre eles, o gene SLC25A12; os genes FOXP2, MET, EN2, RELN, localizados pelo cromossomo 7; os genes RAY1 e AUST2 devido à translocação do cromossomo 7 com o cromossomo 13; o gene GABRB3 encontrado no cromossomo 15; os genes 5-HTRs e SLC6A4 localizados no cromossomo 17; o gene FMR-1 presente no cromossomo X; e os genes da família SHANK, subdivididos em SHANK 1, SHANK 2 e SHANK 3, sendo os genes pertencentes aos cromossomos 2 e 7 os mais relatados nos casos do desenvolvimento do TEA (COUTINHO; BOSSO, 2015).

Por causa dessas mutações juntamente com os fatores ambientais, pacientes com autismo apresentam problemas comportamentais entre os quais se destacam a hiperatividade e a impulsividade; os comportamentos agressivos, autodestrutivos, perturbadores e destrutivos; os problemas sensoriais como hiper ou hipossensibilidade a estímulos visuais, táteis, olfativos e gustativos. Na área médica, pessoas com autismo apresentam frequentemente problemas gastrointestinais (SILVA; MULICK, 2009). Entre os sinais/sintomas apresentados foram constatados: constipação, diarreia, dor abdominal, vômitos, disbiose, doença inflamatória intestinal, insuficiência pancreática exócrina, a intolerância alimentar, o aumento de gases, padrão anormal das fezes, regurgitação de alimentos, seletividade para determinados alimentos, refluxo gastroesofágico (RGE) e dificuldade para controlar o esfíncter anal para a eliminação das fezes (GAZOLA; CAVEIÃO, 2015).

Entretanto, como hoje o autismo não é determinado somente por fatores genéticos, mas também por estar associado aos fatores ambientais, muitos pacientes com essa doença apresentam melhora cognitiva, comportamental e gastrointestinal quando tratados de acordo com o quadro clínico apresentado (FINEGOLD, 2011). Observou-se que pacientes com autismo apresentaram em sua microbiota uma quantidade maior de *Clostridium difficile* em decorrência do desequilíbrio no sistema imunológico, quando comparados com pacientes sem nenhuma alteração genética. Estes pacientes, quando tratados, apresentaram uma melhora significativa no seu quadro clínico (CARVALHO et al., 2012).

Clostridium difficile é um bacilo gram-positivo formador de esporos, podendo pertencer à microbiota normal (VIEIRA, 2010). Entretanto, situações em que um aumento na quantidade desses bacilos, associado à produção de duas toxinas, A e B, é capaz de causar doenças gastrointestinais, tais como: diarreia, colite pseudomembranosa, megacólon tóxico, perfuração colônica e septicemia, que pode levar à morte. O tratamento é feito com vancomicina. Todavia, pacientes que passam por esse tratamento, como no caso dos autistas, correm o risco de recidiva e seleção de cepas resistentes a esse antimicrobiano (FERREIRA, 2013).

Uma possível solução para a cura de indivíduos com alta colonização de *Clostridium difficile* é o transplante de fezes, caracterizado pela infusão de bactérias fecais no intestino do paciente por meio de uma sonda nasogástrica, colonoscópio ou enema com o objetivo de reconstruir a sua microbiota intestinal. As fezes a serem transplantadas são geralmente colhidas de familiares que se enquadrem nos critérios estabelecidos. Após o doador ser selecionado, as fezes são coletadas e infundidas no receptor (GANC et al., 2015).

Outro tratamento é a administração de probióticos e prebióticos para aumentar a colonização de bactérias benéficas no intestino delgado e grosso, a partir da ingestão de microorganismos pertencentes à microbiota intestinal ou de componentes que não são digeridos pelo intestino (MORAIS; JACOB, 2006; SAAD, 2006).

Há a possibilidade de produzir vacinas contra o *Clostridium difficile* com objetivo o estimular a resposta imunológica e proteger contra a colonização de patógenos na microbiota intestinal (FERREIRA, 2013).

Nesse contexto, o presente trabalho vem apresentar as evidências da relação entre o Transtorno do Espectro Autista e a colonização intestinal por *Clostridium difficile* nos portadores desse transtorno.

2.METODOLOGIA

O presente trabalho consiste em uma revisão da literatura no formato narrativo. Foram consultados sites de busca tais como o *Libary Online* SCIELO, o Science Direct, Pubmed e o Google Acadêmico, sobre a relação do Transtorno do Espectro Autista (TEA) com a colonização intestinal por *Clostridium difficile*, suas consequências e o possível tratamento após a aquisição de resistência pela bactéria, tendo como período de busca artigos publicados no período de 1997 a 2015.

Como o sistema imunológico está diretamente ligado a esse processo de colonização, foi feita uma busca para entender essa relação. Para o *Clostridium difficile*, foram especificadas suas características morfológicas, seus fatores de virulência e como ele pode adquirir características de resistência a antimicrobianos. Como a aquisição de resistência é uma problemática, foi abordado sobre um tratamento alternativo, o transplante de fezes. Os descritores utilizados foram: autismo, genética, *Clostridium difficile*, sistema gastrointestinal, sistema imunológico, toxinas A e B, ácido propiônico, tratamento, resistência a antimicrobianos, transplante de fezes, probióticos e prebióticos e vacina; sendo que esses descritores foram pesquisados isoladamente ou aos pares. Os critérios de inclusão dos artigos foram aqueles relacionados a essas palavras-chave, abordagem do tema proposto e artigos em português, espanhol e inglês.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Genética e Autismo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é definido como uma doença multifatorial, caracterizada pelo atraso do desenvolvimento das habilidades sociais, comunicativas e cognitivas (CARVALHO et al.,2012). Além do aspecto genético, os fatores ambientais possuem grande influência sobre o quadro clínico dos autistas, destacando-se entre elas as toxinas, a poluição e a alimentação inadequada e modificada (GAZOLA; CAVEIÃO, 2015). Além disso, pacientes autistas são acometidos por problemas gastrointestinais, como diminuição da produção de enzimas digestivas, inflamações da parede intestinal e permeabilidade intestinal alterada (CARVALHO et al., 2012).

O cromossomo 2 é responsável por expressar o gene SLC25A12, localizado na 2q31.1 e responsável por codificar o transportador aspartato/glutamato mitocondrial (GUPTA; STATE, 2006)

No braço longo do cromossomo 7 encontram-se diversos genes associados ao autismo. O gene FOXP2 está localizado na região 7q31.7 e é necessário para o desenvolvimento da linguagem. Além disso, tem forte influência em órgãos como o pulmão e o intestino. Outro gene envolvido é o RELN, presente na 7q22.7, que é responsável pela produção da proteína reelina, importante para o desenvolvimento cerebral. Existe ainda, o gene MET, encontrado na região 7q31.7 que é responsável pelo desenvolvimento do neocórtex e do cerebelo; o gene EN2 codificado pela região 7q36.3, que está envolvido no desenvolvimento do mesencéfalo e do cerebelo; as translocações entre os cromossomos 7 e 13, que causam a inativação do RAY1, gene de supressão da tumorigenicidade, ou a interrupção da transcrição do gene AUST2, que é expresso intensamente pelo cérebro (COUTINHO; BOSSO, 2015).

O gene GABA está localizado na região 15q11-q13 e tem um importante papel na atividade excitatória cerebral. Mutações nesse gene inibem o controle da atividade excitatória do cérebro (RIBEIRO; FREITAS; OLIVIA-TELES, 2013). Já o gene SLC6A4 é expresso pelo cromossomo 17 e encontra-se na região q11. Esse gene é responsável pela recaptação da serotonina sináptica (GUPTA; STATE, 2006). Além dele há o gene 5-HT₂R, localizado na região 17q11.2, responsável por auxiliar no controle do humor já que codificam receptores de serotonina na membrana pós-sináptica (GUYTON; HALL, 2011).

A mutação do cromossomo X está relacionada com a Síndrome X-Frágil, visto que essa síndrome é devida à expansão repetida de trinucleotídeos CGG, resultante da mutação do gene FMR-1. Devido a essa mutação, o gene deixa de expressar uma proteína essencial para as funções cerebrais normais. Outros genes citados são os genes da família SHANK, SHANK 1, SHANK 2 e SHANK 3, localizados no cromossomo 22. Esses genes codificam proteínas de adesão sináptica e, quando mutadas, causam disfunção sináptica (COUTINHO; BOSSO, 2015).

3.2. Formação da Microbiota Intestinal

A formação da microbiota tem uma grande importância visto que ela possui função de resistência à colonização, ou seja, ela impede o crescimento de

microorganismos patogênicos, imunomodulação e contribuição nutricional. Quando essa colonização não ocorre de forma satisfatória, aumenta a propensão de bactérias não benéficas colonizarem o trato gastrointestinal, causando prejuízos (PENNA, NICOLI, 2001).

O desenvolvimento da microbiota intestinal depende de diversos fatores, tais como o tipo de parto, o tipo de amamentação, a contaminação ambiental, o uso de antimicrobianos, o sistema imunológico e as características genéticas (BARBOSA et al., 2010).

Os bebês que nascem de parto normal quando comparados àqueles que nascem de parto cesáreo, apresentam a formação mais rápida da sua microbiota intestinal. Isso deve ao fato de desses bebês terem entrado em contato direto com microbiota fecal intestinal da mãe. No parto cesáreo, por não terem contato com a microbiota da mãe, a microbiota intestinal desses bebês será formada pelo contato com o meio ambiente, sendo mais comum a colonização por *Bacteroides* e *Clostridium* (ANDRADE, 2010; GROUND et al.).

Em relação à alimentação, os recém-nascidos amamentados com leite materno entram em contato com *Bifidobacterium*, o que é importante para o controle do crescimento populacional de agentes patogênicos aliados ao sistema imunológico. Já os bebês alimentados com leite artificial tem em sua microbiota a presença de *Bacterioides*, enterobactérias, *Enterococcuse Clostridium sp* (HARMESEN et al, 2000).

O que diz respeito à influência genética, as bactérias colonizam o intestino ligando-se a sítios de adesão específicos, ou seja, a partir do momento que os receptores da mucosa intestinal sofrem alterações, a colonização de microorganismos benéficos será prejudicada (ANDRADE, 2010; BRANDT; SAMPAIO; MIUK, 2006)

O trato gastrointestinal de um bebê ainda no útero é estéril e a formação da microbiota ocorre no período de 2 anos após o seu nascimento, a partir do contato com as bactérias que colonizam o intestino. Ao longo desse período, ocorre a seleção das bactérias, ou seja, algumas continuam no intestino e aquelas que podem produzir toxinas são identificadas pelo sistema imunológico, que as eliminará ou controlará seu crescimento no intestino, aliado à colonização das bactérias benéficas que contribuem para a inibição do crescimento de bactérias patogênicas (ANDRADE, 2010).

Até os 2 anos é comum encontrar no intestino *Bifidobacteriu*; *Firmicute*; *Bacterioidete*; *Actinobacteria*, pertencente à família *Bifidobacteriace*; e *Proteobacterias*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Com percentual muito

menor, encontram-se os filos *Synergistetes*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* e *Euryarchaeota*. Fazem parte do filo *Firmicutes* as classes *Bacilli*, *Clostridia* e *Mollicutes*; e do filo *Bacteroidetes*, as classes *Bacterioide*, *Flavobacterium* e *Sphigobacteria* (MORAES et al., 2014).

Após esse período, desenvolvem-se bactérias benéficas para o intestino capazes de fermentar carboidratos, de não produzir toxinas e inibir o crescimento de patógenos por meio da competição, sendo o principal deles o *Clostridium difficile*. Além disso, as bactérias benéficas interagem com o sistema imunológico ao auxiliar na maturação do tecido linfóide associado ao intestino (TLAI) e no desenvolvimento de resistência normal a doenças (BINNS, 2013).

A composição da microbiota intestinal de crianças saudáveis é composta por 63,6% de *Fermicutes*, 30% de *Bactereroidetes*, 1,8% de *Actinobacteria* e 0,5% *Proteobacteria*. Em crianças autistas essa composição é, respectivamente, 39%, 51%, 0,4 a 0,7% e 2,3 a 3,1%. (FINEGOLD, 2011).

3.3 Desordens Gastrointestinais e *Clostridium difficile*

As desordens gastrointestinais podem ser explicadas pelas alterações que ocorrem no sistema imunológico, uma vez que há uma relação de interdependência funcional e uma interligação entre os sistemas nervoso, gastrointestinal e imunológico, posto que a homeostase funcional dos três sistemas é dada por substâncias como hormônios, neuropeptídeos, neurotransmissores e citocinas. Além disso, esses sistemas necessitam de estímulos e interação com o ambiente para que possam se desenvolver normalmente. O sistema nervoso precisa de estímulos sensoriais do meio ambiente, já o sistema gastrointestinal necessita que ocorra a colonização microbiana, substrato alimentar e integridade funcional e morfológica e o sistema imunológico precisa de estímulos antigênicos (PINHO; SILVA, 2011).

Entre os problemas gastrointestinais apresentados por autistas estão a inflamação intestinal com diferentes graus de severidade, a falta da sulfatação hepática, a falta da mieloperoxidase, a insuficiência pancreática pela falta da quimiotripsina e de enzimas digestivas como a secretina, a constipação e a diarreia. Uma desordem gastrointestinal importante é a alteração da permeabilidade intestinal, visto que existe uma associação entre pacientes autistas e doenças inflamatórias intestinais. Em biópsias no íleo foi

constatada a presença frequente de hiperplasia nodular linfoide (HNL) e colites ulcerativas (GONZÁLEZ et al., 2005).

O equilíbrio da parede intestinal é importante para uma absorção adequada de nutrientes, o que permite o bloqueio de determinadas toxinas bacterianas, alérgenos e peptídeos provenientes dos alimentos que podem alcançar a circulação sistêmica, devido à alteração da permeabilidade intestinal (FONSECA; COSTA, 2010, THEIJE et al., 2011).

A alteração da permeabilidade intestinal é caracterizada quando as junções das células epiteliais do intestino, que no seu estado normal deveriam deixar as células justapostas entre elas formando uma barreira epitelial, perdem sua função, aumentando o espaço entre as células do revestimento do intestino (HEBERLIN; DHURJATI, SASSER, 2013).

A alteração da permeabilidade ocorre devido ao processo inflamatório do trato gastrointestinal que pode ser ocasionado pelo uso de antimicrobianos, antiinflamatórios não esteroides, pesticidas, ausência ou insuficiência de enzimas, toxinas microbianas, alimentos, má absorção de proteínas, entre outras. Além disso, a inflamação intestinal altera a função imunológica, uma vez que há uma deficiência na absorção de nutrientes, apresentando uma baixa quantidade da produção enzimática e conseqüentemente uma alteração do microambiente ideal para a manutenção das bactérias benéficas no intestino (MORENO, 2015).

3.4 Sistema Imunológico e *Clostridium difficile*

A mucosa intestinal possui estreita relação com o sistema imunológico, uma vez que esse sistema pode contribuir para o desenvolvimento de diversas desordens no sistema gastrointestinal. As doenças inflamatórias intestinais estão associadas à ativação inadequada do sistema imunológico que ocorre devido à produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias. Ao analisar as fezes de crianças autistas, observou-se a presença da interleucina 1 (IL-1), da interleucina 6 (IL-6) e da interleucina 8 (IL-8). A IL-6 é responsável por estimular e proliferar as células T e pela diferenciação terminal de células B; a IL-8 tem a função de iniciar e de dirigir a quimiotaxia de neutrófilos e a IL-1 está envolvida na estimulação de células T (PINHO; SILVA, 2011).

Além disso, foi observada alteração nas células do tipo T helper (TH1/TH2), diminuição da resposta mitógena das células T, desequilíbrio nos níveis séricos de

imunoglobulinas e nos perfis das citocinas, que são responsáveis pela intensidade e duração da resposta imune. O zinco possui uma relação muito importante com o sistema imune visto que participa da maturação, produção e função dos leucócitos (PERES; KOURY, 2006).

Em decorrência do aumento da permeabilidade intestinal (PINHO; SILVA, 2011), da alta produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e IL-8 (ASHWOOD; WILLS; VAN DE WATE, 2006), da deficiência na absorção de zinco (CARVALHO, 2012) com a consequente diminuição de linfócitos T (SARNI et al., 2010), pacientes com transtorno do espectro autista têm maior probabilidade de apresentarem, em sua microbiota intestinal, maior quantidade de *Clostridium difficile* (GAZOLA; CAVEIÃO, 2015).

3.5 Patogenicidade do *Clostridium difficile*

Clostridium difficile é um bacilo gram-positivo anaeróbio obrigatório, formador de esporos e que apresenta motilidade. Pode ser encontrado na água, no solo, no intestino de diversos animais, em muitos lactentes, na vagina, na uretra e nas fezes de humanos. Porém, essa bactéria pode ser encontrada em apenas 3% dos humanos saudáveis e, quando encontradas não apresentam capacidade de produzir toxinas (KONEMAN et al., 2010).

A infecção por *Clostridium difficile* ocorre quando são ingeridos alimentos ou água contaminada por esporos, estruturas essas resistentes à ação de calor, de substâncias químicas como, por exemplo, substâncias ácidas e detergentes, entre outras. Ao chegarem ao intestino, esses esporos germinarão ao entrarem em contato com os sais biliares ali presentes e se transformarão em seu estado vegetativo, multiplicando-se e, por consequência, causando a colonização seguida de infecção (PEREIRA, 2014).

O *Clostridium difficile* é produtor da enterotoxina, denominada toxina A, e da citotoxina, chamada de toxina B. A toxina A apresenta uma sequência de 2710 aminoácidos e peso molecular de 308 kDa. A toxina B possui uma sequência de 2366 aminoácidos e peso molecular de 279 kDa (ROCHA, 1999). A capacidade de produzir essas toxinas ocorre devido à presença de um *locus* de patogenicidade (PaLoc) que mede 19,6kDa. Esse *locus* é constituído por genes denominados tcdA, tcdB, tcdC, tcdE e tcdR. Os genes tcdA e tcdB codificam as toxinas A e B, já o gene tcdC inibe a expressão do *locus* PaLoc e, em contra partida, o gene tcdR estimula a expressão dos

genes *tcdA* e *tcdB*. O gene *tcdE*, por sua vez, é responsável por codificar uma porina que permite a formação de poros na membrana plasmática para a liberação das toxinas (CARROLL; BARTLETT, 2011).

Tanto a enterotoxina quanto a citotoxina têm atividade glicosiltransferase, implicando a quebra da actina do citoesqueleto, causando a diminuição do controle de entrada e saída de substâncias entre as células epiteliais, o acúmulo de líquido e a destruição de epitélio intestinal. As toxinas se ligam aos receptores das células epiteliais intestinais e entram na célula por endocitose, desencadeando processos que afetam o citoesqueleto de actina e levam à morte celular. Esse processo ocorre a partir da digestão auto proteolítica para que a região N-terminal, que possui um domínio catalítico, se separe do resto da toxina. Essa porção catalítica liga a glucose a determinadas guanosinas-trifosfatase (GTPases), como as proteínas Rho e Rac, iniciando o processo de glicosilação (RODRIGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013).

As GTPases são responsáveis por regular processos envolvidos na manutenção da barreira epitelial e formação do citoesqueleto, além de participar no processo de fagocitose e na produção de citocinas. A glicosilação das GTPases ocasiona a degradação do citoesqueleto de actina, o aumento da permeabilidade da membrana, a perda da função de barreira, a citotoxicidade e a morte celular. As toxinas produzidas pelo *Clostridium difficile* também estão relacionadas a processos inflamatórios devido a uma resposta imune exacerbada, levando à danificação dos tecidos por meio da infiltração de neutrófilos e liberação de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, leucotrienos B4 e interferon γ (ROCHA; SIDRIM; LIMA, 1999).

A toxina A se liga às estruturas glicídicas presentes na superfície das células epiteliais, causando necrose, inibição da síntese de proteínas e ativação de macrófagos e neutrófilos que serão responsáveis por estimular a produção de mediadores inflamatórios, levando a secreção de fluidos e ao aumento da permeabilidade da mucosa. Esse processo causa danos nas microvilosidades intestinais, possibilitando a ocorrência de erosão da mucosa e conseqüentemente produção de um fluido viscoso e sanguinolento (VOTH; BALLARD; 2005).

A toxina B é responsável por induzir dano ao epitélio intestinal, aumentar a permeabilidade da mucosa, estimular a síntese de IL-8 e induzir a resposta inflamatória aguda mediada pelo recrutamento de neutrófilos (LINEVSKY et al., 1997).

Devido à liberação de toxinas pelo *Clostridium difficile*, uma grande quantidade de neutrófilos vai para a mucosa do cólon. Além disso, há a formação de um infiltrado inflamatório agudo com microabcessos e pseudomembranas ricas em neutrófilos, caracterizando o quadro de colite pseudomembranosa. Há também o recrutamento de monócitos, responsáveis por liberar TNF- α e interleucinas, assim como os macrófagos (FERREIRA, 2013).

Devido à alteração da permeabilidade intestinal, linfócitos, mastócitos, células dendríticas, citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ e TNF- α podem entrar na circulação sistêmica e atravessar a barreira hematoencefálica causando alteração na homeostase neuronal (THEIJE et al., 2011).

Além das toxinas A e B, o *Clostridium difficile* tem a capacidade de produzir o ácido propiônico que é um ácido graxo de cadeia e um intermediário importante para o metabolismo celular. Portadores do autismo, dependendo do seu grau de severidade, podem apresentar alteração no metabolismo do ácido propiônico. Foi observado que esse ácido aumenta marcadores do estresse oxidativo, aumenta a atividade da glutatona transferase, diminui a atividade da glutatona peroxidase e glutatona. Além disso, o ácido propiônico provoca o aumento de astroglicoses reativos e de microglia ativada (CD68+), sugestivo de um processo de neuroinflamação (MACFABE et al., 2007).

3.6 Tratamento e Resistência

O tratamento é baseado na gravidade do paciente, sendo que os principais antimicrobianos utilizados são: metronizadol, em casos leves ou moderados, e vancomicina, em casos graves ou em caso de recorrências sucessivas. Há também outras alternativas de tratamento como fidaxomicina, rifaximina, nitazoxanida, imunoterapia e probióticos. Porém, esses pacientes podem apresentar recidiva, ou seja, voltam a ter infecção por *Clostridium difficile*. Essa recidiva é decorrente da seleção de esporos resistentes e da deficiência do sistema imunológico (JÚNIOR, 2012).

Pacientes autistas que foram tratados com vancomicina tiveram uma melhora nos aspectos cognitivos e gastrointestinais após o tratamento. Entretanto, após a suspensão do tratamento, apresentarem recidiva. Além disso, acredita-se que o uso de outros antimicrobianos tais como trimetoprim/sulfametoxazol, fluoroquinolona e certas cefalosporinas podem predispor-los à infecção por *Clostridium difficile*. Isso se deve ao

uso prolongados de antimicrobianos que acarretam seleção de esporos resistentes e capazes de produzir toxinas (FINEGOLD, 2011).

A resistência bacteriana é algo normal, pois sempre que se optar pelo uso de antimicrobianos ocorrerá a seleção de bactérias resistentes ao medicamento utilizado. Existe, ainda, a possibilidade de a bactéria adquirir genes de resistência ao longo do tempo por diversos mecanismos. Além do DNA cromossômico, as bactérias possuem um DNA circular denominado plasmídeo. Esse plasmídeo pode possuir genes que tenham a capacidade de criar mecanismos que impeçam a ação do antimicrobiano ou por produção de enzimas de degradação, ou por mudança na conformação das PBP's ou por bomba de efluxo, ou mudança na permeabilidade da parede bacteriana (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

3.7 Alternativas de Tratamento

Acredita-se que pelo fato de o Transtorno do Espectro Autista ser uma doença complexa, envolvendo fatores genéticos e ambientais, pode encontrar diversos tipos de tratamento e a escolha do tratamento é feita de acordo com o grau de severidade de cada paciente (HEBERLING; DHURJATI; SASSER, 2013).

3.7.1 Transplante de fezes

O transplante de fezes caracteriza-se pela infusão de bactérias fecais por meio de uma sonda nasogástrica, colonoscópio ou enema com o objetivo de reconstruir a microbiota intestinal do paciente. As fezes a serem transplantadas, geralmente, são colhidas de familiares que se enquadrem nos critérios estabelecidos, tais como: não ter feito uso de antimicrobianos nos últimos seis meses, não ser imunocomprometido e não ter antecedente de uso de drogas ilícitas, tumor ou doença inflamatória intestinal. Além disso, o doador passa por exames de triagem: sorologia para hepatite A, B e C, sorologia para o vírus da imunodeficiência (HIV), protoparasitológico de fezes, pesquisa de *Clostridium difficile* nas fezes e cultura fecal. Após o doador ser selecionado, as fezes são coletadas e diluídas com soro fisiológico 0,9% e infundidas no receptor, que deve ter sido previamente submetido a uma lavagem intestinal (GANC et al., 2015).

3.7.2 Probióticos e Prebióticos

Os probióticos são microorganismos vivos que são administrados em quantidades adequadas com a finalidade de trazer benefícios à saúde como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, levando a resistência contra patógenos a partir de sua multiplicação, inibindo o crescimento das bactérias patogênicas (SAAD, 2006). Já os prebióticos são definidos como componentes que não sofrem digestão e são absorvidos pelo intestino delgado. Ao chegarem no cólon estimulam a proliferação de bactérias benéficas com a consequente inibição de bactérias patogênicas (MORAIS; JACOB, 2006; SAAD, 2006). Entretanto, a utilização de probióticos e prebióticos tem seu efeito limitado em autistas (HEBERLING; DHURJATI; SASSER; 2013)

3.7.3 Vacinas

A vacina contra o *Clostridium difficile* tem o objetivo de estimular a resposta imunológica e proteger contra a colonização de patógenos na microbiota intestinal. A vacinação é feita a partir de esporos que expressam domínios de repetição tanto das toxinas A quanto das B, produzidas pelo *Clostridium difficile*. A imunização com esses esporos estimulou a produção de altas concentrações de anticorpos IgA e IgG, protegendo o indivíduo contra ambas as toxinas. Porém, a produção dessa vacina encontra-se ainda em investigação (FERREIRA, 2013).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma doença de herança complexa multifatorial, ou seja, alterações genéticas e os fatores ambientais influenciam no quadro clínico desses pacientes. Como não é uma doença em que suas características são apenas determinadas pela genética, é importante que mais estudos sejam realizados com a finalidade de melhorar a qualidade de vida de pessoas autistas.

Esses pacientes apresentam quadros de diarreia, constipação, colites inflamatórias. Também observa-se uma microbiota intestinal diferente quando comparada com a de pacientes saudáveis, alteração na permeabilidade intestinal e sistema imunológico ineficiente, permitindo a aderência de *Clostridium difficile* na parede do intestino. A partir de então toxinas passam a ser liberadas e entram na

circulação sistêmica, atravessando a barreira hematoencefálica e causando alterações neurológicas.

A grande problemática no tratamento dos pacientes autistas, que tem seu intestino colonizado pelo *Clostridium difficile*, é a resistência contra a vancomicina, considerado o principal tratamento para combater esse agente etiológico. Com a finalidade de resolver essa questão, outras formas de tratamento como o transplante de fezes e o uso de probióticos e prebióticos, estão sendo experimentados.

Como tentativa de prevenção, deve-se optar pelo parto normal e pela amamentação com leite materno, objetivando aumentar as chances de as bactérias benéficas colonizarem o intestino e retardar a proliferação de bactérias patogênicas em pessoas com transtorno do espectro autista que possuem alterações intestinais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A. **Microflora intestinal: uma barreira imunológica desconhecida.** 2009/2010. 24f. Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar na Universidade do Porto, Portugal, 2009/2010.

ASHWOOD, P.; WILLS, S; VAN DE WATE, J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. **Journal of Leukocyte Biology**, Sacramento, v. 80, n. 1, p. 1-15, jul. 2006.

BARBOSA, F. H. F. et al. Microbiota indígena do trato gastrointestinal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba v. 10, n.1, p, 78-93, jun. 2010.

BINNS, N. **Probióticos, prebióticos e a microbiota intestinal.** São Paulo: ILSI Europe, 2013.

BRANDT, K; SAMPAIO, M; MIUKI, C. Importance of the intestinal microflora. **Pediatria**, São Paulo, v.28, n.2, p.117-127, ago./set. 2006.

CARVALHO, J.A.et al. Nutrição e autismo: considerações sobre a alimentação do autista. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.5, n.1, p.1-7, jan. 2012.

CARROL, K. C; BARTLETT, J. G. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. **Annual Review Microbiology**, Baltimore, v. 65, p.501-525, oct. 2011.

COUTINHO, J.V.S.C.; BOSSO, R.M. V. Autismo e genética: uma revisão de literatura. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.8, n.1, p.1-14, jan. 2015.

FERREIRA, S. C. S. **Colite Pseudomembranosa associada aos antimicrobianos**. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

FINEGOLD, S. M. State of the art; microbiology in health and disease: intestinal bacterial flora in autism. **Elsevier**, Filadelfia, v. 17, n. 6, p. 367 - 368

FONSECA, F. C. P.; COSTA, C. L. Influência da nutrição sobre o sistema imune intestinal. **Revista Ceres**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 163-174, ago. 2010.

GANC, A. J. et al. Transplante de microbiota fecal por enteroscopia alta para tratamento da diarreia causada por *Clostridium difficile*. **Eistein**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 338 - 339, fev. 2015.

GUYTON, A. C; JOHN, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 1151.

GAZOLA, F.; CAVEIÃO, C. Ingestão de lactose, caseína e glúten e o comportamento do portador de autismo. **Revista Saúde Quântica**, Maringá, v. 8, n. 4, p. 53-61, jan-dez. 2015.

GONZÁLEZ, L. et al. Características endoscópicas, histológicas e imunológicas de la mucosa digestivas en niños autistas con síntomas gastrointestinales. **Anchivas Venezolonas de Pericultura y Pediatría**, Caracas, v. 69, n.1, p. 19-25, jan/mar. 2005.

GROUND, H. et al. Fecal microflora infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery: **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutritions**, Amsterdã, v. 28, n.1, p.19-25, jan. 1999.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 667-679, fev.2010.

HARMSSEN, B. et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutritions**, Amsterdã, v.30, n.1, p.61-67, jan. 2000.

HEBERLING, C. A.; DHURJATI, P. S.; SASSER, M. Hypothesis for a systems connectivity model of autism spectrum disorder pathogenesis: Links to gut bacteria, oxidative stress, and intestinal permeability. **Medical Hypotheses**, Newark, v. 80, n.3, p. 264-270, mar. 2013.

JUNIOR, M. S. Recentes Mudanças da infecção por *Clostridium difficile*. **Eistein**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 105-109, mar. 2012.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 893.

LINEVSKY, J. K. et al. IL-8 release and neutrophil activation by *Clostridium difficile* toxin-exposed human monocytes. **American Journal of Physiology**, Boston, v. 273, n. 6, p. 1333-1340, dez. 1997.

MACFABE, D. F. et al. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. **Behavioural Brain Research**, London, v. 176, n.1, p.149-169, jan. 2007.

MORAES, A. C. F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismo e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 58, n.4, p. 317-327, jun. 2014.

MORAES, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos na prática pediátrica. **Jornal Pediátrico**, Porto Alegre, v. 82, n. 5, nov. 2006.

MORENO, X. et al. Microbiota gastrointestinal aeróbica en niños con trastorno del espectro autista. Estudio preliminar. **Gen**, Caracas, v. 69, n.2, p.36-44, jul. 2015.

PENNA, J. P.; NOCOLI, J. R. Influência do colostro na colonização bacteriana normal do trato digestivo do recém-nascido. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.77, n.4, p.251-252, jul/ago. 2001.

PEREIRA, N. G. Infecção pelo *Clostridium difficile*. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 27-49, set/out. 2014.

PERES, P. M.; KOURY, J. C. Zinco, imunidade, nutrição e exercício. **Revista Ceres**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 9-18, jul. 2006.

PINHO, M. A.; SILVA, L.R. Manifestações digestórias em portadores de transtorno do espectro autístico: necessidade de ampliar as perguntas e respostas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 304 - 309, set-dez. 2011.

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C.; LIMA, A. A. O *Clostridium difficile* como agente indutor de diarreia inflamatória. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 32, n. 1, p. 47 - 52, fev. 1999.

RODRIGUEZ-PARDO, D.; MIRELIS, B.; NAVARRO, F. Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. **Elsevier**, Barcelona, v. 31, n. 4, p. 254-263. abr. 2013.

SARNI, R. O. S. et al. Micronutrientes e sistema imunológico. **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 8-13, maio. 2010.

THEIJE, C. G. M. et al. Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. **European Journal of Pharmacology**, Utrecht, v. 688, n.1, p. 70-80, set. 2011.

VIEIRA, A. M. et al. Diarreia Associada a *Clostridium difficile* num Hospital Central. **Jornal Português de Gastroenterologia**, Lisboa, v. 17, n. 1, p. 10 - 17, jan. 2010.

VOTH, D. E.; BALLARD, J. D. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Oklahoma, v. 18, n. 2, p. 247-263, abr. 2005.