



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

**WEBER GUTEMBERG ALVES DE OLIVEIRA**

**PREBIÓTICOS MELHORAM COMPORTAMENTOS INDICADORES ASSOCIADOS  
À ANSIEDADE EM MODELO ANIMAL**

**WEBER GUTEMBERG ALVES DE OLIVEIRA**

**PREBIÓTICOS MELHORAM COMPORTAMENTOS INDICADORES ASSOCIADOS  
À ANSIEDADE EM MODELO ANIMAL**

Tese de Doutorado apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia e Saúde Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

636.213  
O48p

Oliveira, Weber Gutemberg Alves  
Prebióticos melhoram comportamentos indicadores associados à ansiedade em modelo animal / Weber Gutemberg Alves de Oliveira - Presidente Prudente, 2020.  
101f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)  
- Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.  
Bibliografia.  
Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

1. Teste de Campo Aberto. 2. Eixo-Intestino-Cérebro. 3. Alimento funcional. 4. Corticosterona. 5. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. 6. Microbiota Intestinal. I  
Título.

Catlogação na Fonte: Michele Mogni – CRB 8-6204

**WEBER GUTEMBERG ALVES DE OLIVEIRA**

**PREBIÓTICOS MELHORAM COMPORTAMENTOS INDICADORES ASSOCIADOS  
À ANSIEDADE EM MODELO ANIMAL**

Tese de Doutorado apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia e Saúde Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 10 de setembro de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Hermann Bremer Neto  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla  
Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP  
Piracicaba - SP

---

Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches  
Universidade Santo Amaro- UNISA  
São Paulo - SP

---

Prof. Dr. Alexandre Duarte Gigante  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Rogério Giufrida  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus amados pais, à minha esposa, companheira e incentivadora, à minha inspiração maior que é meu filho, à minha irmã e aos amigos verdadeiros.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, Brasil. Porém não tiveram nenhum envolvimento no desenho do estudo, na coleta, análise ou interpretação de dados, na redação do manuscrito, ou na decisão de publicar os resultados. Especialmente ao meu Orientador, Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, pela competência, inteligência, compreensão, excepcional bom humor que soube sempre usar nas horas tensas, à paciência e principalmente por acreditar na minha missão.

À banca examinadora, Prof. Dr. Rogério Giufrida que com um olhar cirúrgico fez precisas observações em minha qualificação, ao Prof. Dr. Alexandre Duarte Gigante pela colaboração técnica e científica e importantes considerações para a conclusão deste trabalho, ao Prof. Dr. Osimar por aceitar colaborar e estar sempre disposto a compartilhar seu conhecimento científico, ao Prof. Dr. Adibe que frente as palavras de admiração e respeito do meu orientador para com ele, já me faz respeitá-lo e ser grato por participar deste momento importante em minha vida profissional.

Aos colegas imprescindíveis para a elaboração deste trabalho, meus parceiros Marcos Rufino e Heliard Caetano pela paciência, companheirismo e muitos momentos agradáveis nesta batalha.

Àqueles que me deram a vida e oportunidade de estudar, meus amados pais, Alzira e Rolemberg.

À minha esposa e companheira em todas as horas Margarete, meu alicerce, e ao meu filho Artur que é a inspiração para lutar, a minha querida irmã Karina, pelo sentimento de amor de irmão.

Aos meus amigos de incentivo, Wagner Caetano e Claudio Najas, que sempre estiveram na torcida por este momento.

À Cristina Rainho, que trouxe a voz do inconsciente para a interpretação dos meus desafios.

À competente e eficaz Keid, que muito bem executa suas funções nesta instituição e que em determinado momento suas palavras foram determinantes para eu não desistir.

*“A sabedoria é a meta da alma humana, mas a pessoa,  
à medida que em seus conhecimentos avança, vê o  
horizonte do desconhecido cada vez mais longe.”*

Heráclito de Éfeso

## RESUMO

### **Prebióticos melhoram comportamentos indicadores associados à ansiedade em modelo animal**

Ansiedade é um transtorno mental comum, com elevadas taxas de prevalência e relevantes custos sociais e pessoais, que demandam novas terapêuticas para o seu tratamento. Estas alterações de comportamento podem remodelar a composição da microbiota intestinal por meio de hormônios do estresse, inflamação e alterações autonômicas, assim como promover o consumo de alimentos altamente palatáveis, influenciando quais bactérias intestinais prosperam. Por sua vez, bactérias intestinais podem liberar metabólitos, toxinas e neuro-hormônios que alteram o comportamento alimentar e o humor. A suplementação de alimentos funcionais, demonstrou modificar benéficamente a composição da microbiota intestinal, pois a microbiota que recebe prebióticos fornece aos microrganismos benéficos vantagem competitiva sobre outras bactérias do ecossistema colônico, além disso, a microbiota que recebe prebióticos fermentam esse alimento funcional, o que eleva a oferta de energia ao hospedeiro na forma de ácidos graxos de cadeia curta, além de reduzir níveis de corticosterona e elevar o ácido gama amino butírico. Estes produtos resultantes são liberados na circulação sanguínea, afetando o trato GI, e também outros órgãos distantes como o sistema nervoso central. Realizamos uma revisão narrativa com o objetivo de descrever os efeitos dos prebióticos em indicadores de ansiedade em modelo animal, fornecendo informações sobre carboidratos bioativos, com ênfase em suas propriedades prebióticas em murinos. Complementar a esta, estruturamos uma revisão sistemática com meta-análise para responder a questão: Os prebióticos melhoram comportamentos indicadores de ansiedade? Os dados e artigos utilizados na revisão sistemática e na meta-análise foram obtidos durante o mês de julho de 2018, e a estratégia de pesquisa foi repetida em julho de 2019. O teste de campo aberto (OF), nível sérico de corticosterona e a mudança do perfil da microbiota foram considerados como os parâmetros primários de interesse dessa investigação. Os cálculos das meta-análises foram realizados através do software RevMan 5.3. Encontramos 411 artigos completos, resumos, artigos de revisão ou capítulos de livros que traziam as palavras-chave utilizadas na pesquisa bibliográfica, destes, ao final da triagem e avaliação, seis estudos experimentais preencheram os critérios de inclusão na meta-análise. Os resultados da revisão sistemática e das meta-análises apontam que o uso de prebióticos tem efeitos benéficos, que reduzem direta ou indiretamente comportamentos indicadores de ansiedade em murinos, e estes benefícios estão relacionados à redução dos níveis de corticosterona e ao aumento da população de bactérias benéficas, em particular *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.. Este trabalho sugere ainda iniciar novos estudos utilizando prebióticos como alternativa terapêutica ou terapia complementar ao tratamento convencional dos comportamentos ansiosos em humanos, tendo em vista que a microbiota benéfica e sua conexão com regiões cerebrais reconhecidas como moduladoras de emoções e de resposta neuroendócrina ao estresse podem estar subjacentes à fisiopatologia da ansiedade.

**Palavras-chave:** Teste de Campo Aberto; Eixo Intestino-Cérebro; Alimento Funcional; *Lactobacillus* ssp.; *Bifidobacterium* ssp.; Corticosterona.

## ABSTRACT

### Prebiotics improve indicator behaviors associated with anxiety in an animal model

Anxiety is a common mental disorder, with high prevalence rates and relevant social and personal costs, which demand new therapies for their treatment. These behavioral changes can reshape the composition of the intestinal microbiota by means of stress hormones, inflammation and autonomic changes, as well as promoting the consumption of highly palatable foods, influencing which intestinal bacteria thrive. In turn, intestinal bacteria can release metabolites, toxins and neurohormones that alter eating behavior and mood. Supplementation of functional foods has been shown to beneficially modify the composition of the intestinal microbiota, as the microbiota that receives prebiotics provides beneficial microorganisms with a competitive advantage over other bacteria in the colonic ecosystem, in addition, the microbiota that receives prebiotics ferment this functional food, which elevates the supply of energy to the host in the form of short-chain fatty acids, in addition to reducing levels of corticosterone and raising the gamma amino butyric acid. These resulting products are released into the bloodstream, affecting the GI tract, as well as other distant organs such as the central nervous system. We conducted a narrative review in order to describe the effects of prebiotics on anxiety indicators in an animal model, providing information on bioactive carbohydrates, with an emphasis on their prebiotic properties in murines. In addition to this, we have structured a systematic review with meta-analysis to answer the question: Do prebiotics improve anxiety-indicating behaviors? The data and articles used in the systematic review and meta-analysis were obtained during the month of July 2018, and the research strategy was repeated in July 2019. The open field test (OF), serum corticosterone level and the changing the profile of the microbiota were considered as the primary parameters of interest in this investigation. The calculations of the meta-analyzes were performed using the RevMan 5.3 software. We found 411 complete articles, abstracts, review articles or book chapters that included the keywords used in the bibliographic research, of these, at the end of the screening and evaluation, six experimental studies met the inclusion criteria in the meta-analysis. The results of the systematic review and meta-analyzes indicate that the use of prebiotics has beneficial effects, which directly or indirectly reduce behaviors that indicate anxiety in murines, and these benefits are related to the reduction of corticosterone levels and to an increase in the population beneficial bacteria, in particular *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.. This work also suggests starting new studies using prebiotics as a therapeutic alternative or complementary therapy to the conventional treatment of anxious behaviors in humans, considering that the beneficial microbiota and its connection with brain regions recognized as modulators of emotions and neuroendocrine response to stress may be underlying the pathophysiology of anxiety.

**Keywords:** Open Field Test; Axis-Intestine-Brain; Functional Food; *Lactobacillus* spp.; *Bifidobacterium* spp.; Corticosterone.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO 1: Revisão sistemática e meta-análise de estudos pré-clínicos evidencia efeitos benéficos dos prebióticos em indicadores de ansiedade.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO 2: A influência dos prebióticos no eixo microbiota-cérebro e seus desfechos nos comportamentos de ansiedade.....</b>	<b>44</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>71</b>
	<b>ANEXO A: PARECER DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)-UNOESTE.....</b>	<b>71</b>
	<b>ANEXO B: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA: ARTIGO 1 – BIOLOGICAL PSYCHIATRY.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXO C: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA: ARTIGO 2 – JOURNAL OF ANXIETY DISORDERS.....</b>	<b>90</b>

## ARTIGO 1

### Revisão Sistemática e Meta-Análise de Estudos Pré-Clínicos Evidencia Efeitos Benéficos dos Prebióticos em Indicadores de Ansiedade

Weber Gutemberg Alves de Oliveira<sup>b</sup>; Luciano Junior Cano Freitas<sup>a</sup>; Samir Nozawa<sup>a</sup>; Heliard Rodrigues dos Santos Caetano<sup>b</sup>; Marcos Natal Rufino<sup>b</sup>, Hermann Bremer-Neto<sup>b,\*</sup>

a: Faculdade de Medicina, Universidade do Oeste Paulista, São Paulo, Brasil.

b: Departamento de Ciências Funcionais, Universidade do Oeste Paulista, São Paulo, Brasil.

## RESUMO

**CONTEXTUALIZAÇÃO:** Os transtornos mentais acometem bilhões de pessoas em todo o mundo, em particular, ansiedade, afetando cerca de 10% da população mundial. O eixo microbiota-intestino-cérebro desempenha um papel relevante nas mudanças comportamentais associadas a transtornos de ansiedade e alimentos funcionais, prebióticos, demonstraram capacidade de modular o crescimento e atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios comportamentais em humanos e murinos. Nessa revisão sistemática com meta-análise procuramos integrar os resultados dos estudos incluídos e aumentar o poder estatístico dos efeitos dos prebióticos sobre comportamentos indicadores de ansiedade em murinos.

**MÉTODOS:** Os artigos selecionados foram obtidos até julho de 2019 nas bases de dados "Pub Med", "ScienceDirect" e "SciELO" utilizando as palavras-chave ansiedade e prebiótico. O teste de campo aberto (OF), nível sérico de corticosterona e a mudança do perfil da microbiota intestinal (*Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) foram eleitos como desfecho primário.

**RESULTADOS:** Foram encontrados 411 estudos completos, resumos ou capítulos de livros que traziam as palavras-chave usadas na busca na literatura. Desses, 24 estudos foram potencialmente escolhidos para avaliação posterior. No final do processo de seleção, seis ensaios experimentais preencheram os critérios de inclusão. Os resultados obtidos demonstram efeitos benéficos de compostos prebióticos associados à mudança de comportamento: teste de Campo Aberto, nível sérico de corticosterona e a mudança do perfil da microbiota.

**CONCLUSÕES:** Tais achados apontam que alimentar a microbiota intestinal com prebióticos é uma alternativa plausível como tratamento modelador do comportamento nos domínios relevantes para ansiedade e sugerem ser necessários novos estudos utilizando prebióticos como alternativa terapêutica ou terapia complementar dos comportamentos ansiosos em humanos, tendo em vista que a microbiota benéfica e sua conexão com regiões cerebrais reconhecidas como moduladoras de emoções e de resposta neuroendócrina ao estresse podem estar subjacentes à fisiopatologia da ansiedade.

**Palavras-chave:** Teste de Campo Aberto; Eixo-Intestino-Cérebro; Alimento funcional; *Lactobacillus* spp.; *Bifidobacterium* spp.; Corticosterona; Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal; Microbiota Intestinal.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Mental disorders affect billions of people around the world, in particular anxiety, affecting about 10% of the world population. The microbiota-gut-brain axis plays an important role in behavioral changes associated with anxiety disorders and functional, prebiotic foods, which demonstrated the ability to modulate the growth and activity of the intestinal microbiota, conferring behavioral benefits in humans and murines. In this systematic review with meta-analysis, we seek to integrate the results of the included studies and increase the statistical power of the effects of prebiotics on behavioral indicators of anxiety in murines.

**METHODS:** The selected articles were obtained until July 2019 in the databases "Pub Med", "ScienceDirect" and "Scielo". The open field test (OF), serum corticosterone level and the change in the profile of the intestinal microbiota, (*Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.) were chosen as the primary outcome. 411 complete studies, abstracts or book chapters were found that contained the keywords used in the literature search. Of these, 24 studies were potentially chosen for further evaluation. At the end of the selection process, six experimental trials met the inclusion criteria.

**RESULTS:** The results obtained demonstrate beneficial effects of prebiotic compounds associated with behavior change: Open Field test, serum corticosterone level and the change in the microbiota profile.

**CONCLUSIONS:** These findings point out that feeding the intestinal microbiome with prebiotics is a plausible alternative as a behavioral shaping treatment in all domains relevant to anxiety and suggests that further studies using prebiotics as a therapeutic alternative or complementary therapy for anxious behaviors in humans are necessary, taking into account considering that the beneficial microbiota and its connection with brain regions recognized as modulators of emotions and neuroendocrine response to stress may be underlying the pathophysiology of anxiety.

**Keywords:** Open Field Test; Axis-Intestine-Brain; Functional food; *Lactobacillus* spp.; *Bifidobacterium* spp.; Corticosterone; Hypothalam-Pituitary-Adrenal Axis; Intestinal Microbiota.

## 1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios neuropsiquiátricos afetam mais de um bilhão de pessoas e representam 30% dos casos de doenças não letais, causando sobrecarga para os sistemas de cuidados de saúde em todo o mundo. Os transtornos de ansiedade são os transtornos mentais mais comuns, caracterizados por medo perturbador, preocupação e mudanças comportamentais, sendo que aproximadamente 16% da população mundial experimentará essa enfermidade durante toda a vida (1) e associado à significativa morbimortalidade (2).

Transtornos de ansiedade têm sido tratados com terapias cognitivo-comportamental e/ou farmacoterapia, porém podem ter efeitos negativos e contraindicações importantes (3,4).

Evidências crescentes sugerem que o eixo microbiota-intestino-cérebro desempenha um papel fundamental na regulação das funções cerebrais, processamento emocional e comportamento (5,6). Em humanos, a ausência de microbiota intestinal saudável demonstrou influenciar o desenvolvimento do pensamento ansioso (7), e em murinos, alterações na microbiota intestinal promoveram mudanças comportamentais associadas a transtornos de ansiedade (8).

Substratos, como os prebióticos, suplementados na dieta e utilizados seletivamente pelos microrganismos hospedeiros, demonstraram capacidade de modular o crescimento e atividade da microbiota intestinal, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (6,9–15). Em murinos, a suplementação na dieta com diferentes prebióticos demonstrou efeitos benéficos no desempenho de animais no teste de campo aberto (utilizado para avaliar comportamento semelhante à ansiedade), diminuição dos níveis séricos de corticosterona e aumento das quantidades cecais de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (6,9,10,12–15). Em humanos, poucos ensaios clínicos confirmaram estas evidências e os seus benefícios (16).

O objetivo dessa revisão sistemática com meta-análise foi integrar os resultados dos estudos incluídos e aumentar o poder estatístico dos efeitos dos prebióticos sobre comportamentos indicadores de ansiedade em murinos.

## 2 METODOLOGIA

A revisão sistemática para realização da meta-análise deste trabalho foi conduzida de acordo com as recomendações do CAMARADES (*Collaborative Approach to Meta Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies*) e o protocolo está registrado no SyRF (Systematic Review Facility) (<http://syrf.org.uk>). Para o relatório foi seguido as diretrizes descritas no *Preferred Report Items for Systematic Reviews and Meta-Analyzes* (PRISMA) (17).

### 2.1 Estratégia de Pesquisa

Os dados e artigos utilizados na revisão sistemática foram obtidos durante o mês de julho de 2018, e a estratégia de pesquisa foi repetida em julho de 2019. As buscas foram realizadas nas bases eletrônicas de dados científicos “Pub Med”, “ScienceDirect” e “Scielo” disponíveis na Internet. Para as buscas, foram utilizadas as palavras-chave ansiedade e prebióticos, que são aceitas como Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e *Medical Subject Headings* (MeSH). Estes termos foram utilizados em conjunto nos idiomas inglês e português. Para tornar as pesquisas mais abrangentes, nesta fase, todos os resultados obtidos foram analisados sem restrição de datas, idioma de publicação ou categoria, incluindo artigos completos, resumos e capítulos de livros.

### 2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão para Seleção de Estudos

Os trabalhos que continham as palavras-chave foram selecionados e analisados de maneira independente por dois pesquisadores do grupo (Oliveira, W.G.A. e Rufino, M.N), e em caso de discordância, um terceiro autor foi consultado (Bremer-Neto, H.). Registros duplicados e trabalhos que não estavam relacionados aos objetivos propostos foram manualmente excluídos após análise dos títulos e / ou resumos. Foram selecionados trabalhos completos que estudaram o seguinte P.I.C.O.: (1) população: ratos ou camundongos expostos ou não a fatores provocadores de estresse; (2) intervenção: suplementação com prebióticos; (3) controle: grupos expostos ou não a fatores provocadores de estresse e não suplementados; (4) desfechos: Avaliação dos indicadores de

ansiedade. Ensaios clínicos em outras espécies, estudos-piloto, artigos de revisão e trabalhos que não abordaram o objetivo desta meta-análise foram excluídos.

### 2.3 Extração de Dados

Para extração dos dados foi elaborada uma tabela com as seguintes informações de cada estudo: autor(es) / ano de publicação, prebiótico utilizado, tempo de duração do experimento, número de animais por grupo, parâmetros estudados. Os dados obtidos dos artigos selecionados estão apresentados na tabela 2.

### 2.4 Parâmetros de Interesse

O teste de campo aberto (OF), nível sérico de corticosterona e a mudança do perfil da microbiota foram considerados como os parâmetros primários de interesse dessa investigação. O teste de campo aberto, inclui duas medidas diferentes: o número de entradas no centro do OF e o tempo de permanência no centro do OF. Os níveis séricos de corticosterona (ng/mL) foram avaliados pelo método ELISA, ou por radioimunoensaio (RIE). A mudança no perfil da microbiota foi avaliada pela da quantidade de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., expressos como logaritmo da contagem de unidades formadoras de colônias (log UFC/g de fezes) ou em porcentagem de abundância e estes dados foram meta-analisados.

Foram considerados parâmetros secundários o peso corporal(g), consumo da dieta, teste de labirinto em cruz elevado (LCE), labirinto em Y (LY), labirinto de água de Morris (LAM), teste de nado forçado (NF), caixa claro-escuro (CCE), teste de enterramento de mármore (EM), formação de ácido graxo de cadeia curta cecal (SCFA), expressão de receptores hipocampal para ácido gama amino butírico (GABA), interleucina-1 (IL-1) hipocampal IL-6 hipocampal, IL-10 hipotalâmico, fator de necrose Tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) hipocampal, fator neurotrófico de derivado do cérebro (BDNF) hipocampal, receptor 1 do fator de liberação de corticotrofina (CRFR1) hipotalâmico, receptor N-metyl-D-aspartato (NMDA) hipotalâmico, e estes dados não foram meta-analisados.

## 2.5 Avaliação do Risco de Viés

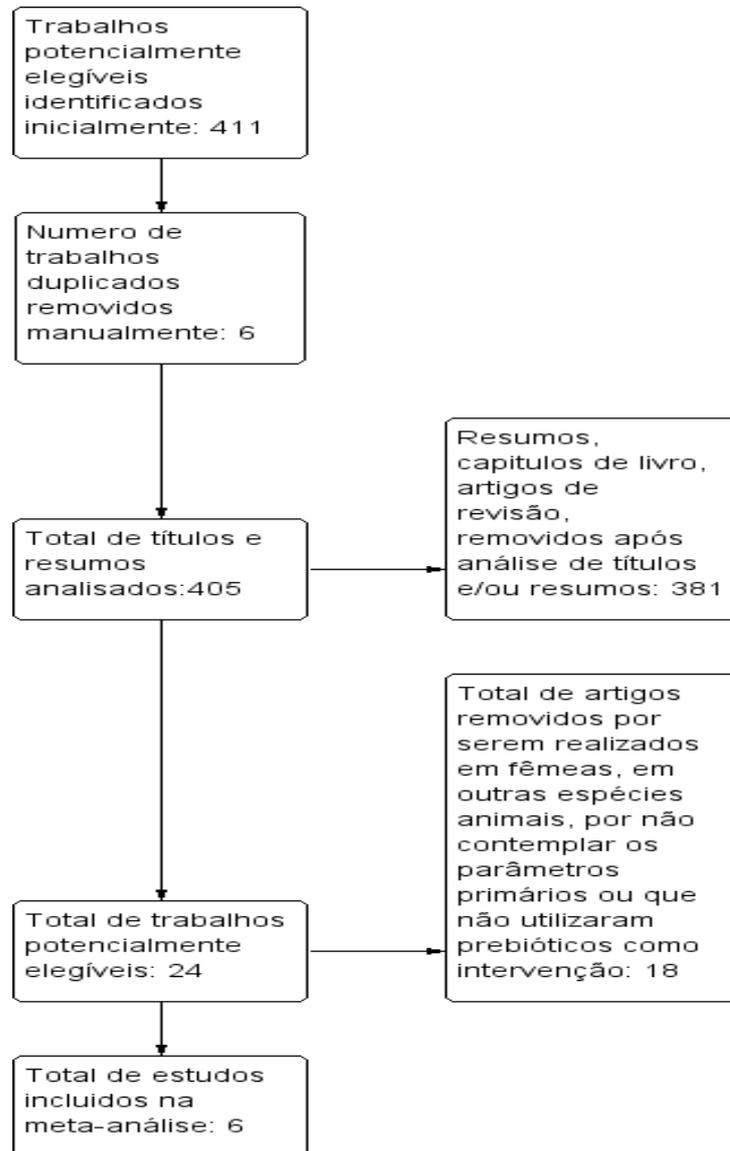
A avaliação do risco de viés foi realizada utilizando o protocolo adaptado do *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*, e implementado pelo software Review Manager – RevMan 5.3. Os estudos foram classificados por dois autores (Oliveira, W. G. A. e Rufino, M.N) que analisaram o viés na seleção dos animais, viés de alocação, viés de desempenho (cegamento de pessoal envolvido no tratamento dos animais), detecção de viés de resultados (cegamento dos avaliadores) e viés de publicação.

## 2.6 Análise Estatística

Os cálculos das meta-análises foram implementados utilizando o software RevMan 5.3. Para análise do inverso da variância, utilizamos as médias e desvios-padrão dos resultados de cada estudo para comparar os dados encontrados. Quando os dados foram apresentados em mediana e intervalo de confiança, as médias e desvios-padrão foram estimados de acordo com os cálculos descritos por Hozo et al (2005) (18). A heterogeneidade foi avaliada usando o  $Q^2$  e teste  $I^2$ ; a significância foi definida como  $P < 0.10$  ou  $I^2 > 50\%$ . Os efeitos fixos dos tratamentos foram analisados; no entanto, quando observamos heterogeneidade significativa entre os estudos, consideramos os efeitos aleatórios.

## 3 RESULTADOS

Ao todo foram encontrados 411 artigos completos, resumos, artigos de revisão ou capítulos de livros que traziam as palavras-chave utilizadas na pesquisa bibliográfica. Destes, após triagem de títulos e resumos, 24 foram potencialmente escolhidos para avaliação posterior, e após avaliação completa dos trabalhos, seis estudos experimentais (6,9,10,12,13,15) preencheram os critérios de inclusão e são apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma do PRISMA mostrando as etapas do processo de seleção da literatura e motivos de exclusão.

### 3.1 Características dos Estudos Incluídos

Os trabalhos selecionados estudaram os efeitos do tratamento com diferentes prebióticos sobre os indicadores de comportamentos semelhantes à ansiedade. Para as meta-análises foram considerados os resultados dos grupos controle e tratados com prebióticos: Frutoligossacarídeos (FOS), Galactoligossacarídeos (GOS), Inulina, Oligofrutose, Polidextrose (PDX), Sialilactose 6 e Sialilactose 3. As doses utilizadas e a composição de cada prebiótico estão descritas na Tabela 1.

A duração dos estudos incluídos nas meta-análises variou entre duas e 10 semanas, e

utilizaram um total de 168 animais (ratos e camundongos) divididos entre grupos controle e tratamento. Os trabalhos incluídos foram publicados entre os anos de 2015 e 2019. Três estudos descreveram à randomização (10,12,15), e o resumo das características dos estudos estão representados na Tabela 2.

Os parâmetros considerados primários nesta meta-análise avaliaram o teste de Campo Aberto (para quantificar comportamentos indicadores de ansiedade), corticosterona sérica (ng/mL) e a mudança no perfil da microbiota [quantidade cecal de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. [contagem de unidades formadoras de colônias (log UFC / g de fezes)], conforme representados na Tabela 3.

Os testes de comportamento em quatro estudos foram realizados com os animais sendo divididos em subgrupos de acordo com a existência ou não de diferentes agentes estressores o qual foram submetidos, conforme representados na Tabela 4.

**Tabela 1. Composição e Dose dos Prebióticos utilizados em cada Estudo**

Autores/ ano de publicação	Prebióticos	Dose*	Composição
Burokas et al. (2017) (6)	Bimuno - BGOS (Healy Group, Dublin, Ireland)	13,1g/dia/Kg P.V.	Frutooligossacarídeo (FOS) e Galactooligossacarídeo (GOS)
Barrera-Bugueño et al. (2017) (9)	Inulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA)	3,13 g/dia/Kg P.V.	Inulina
De Cossío et al. (2017) (10)	OFS - Orafti®P95 (Beneo Orafti, Belgium)	15,2g/dia/Kg P.V.	Oligofructose (OFS)
Mika et al. (2018) (13)	Galacto-oligossacarídeo (GOS) Polidextrose (PDX) Mead Johnson Nutrition (MJN, Evansville IN – U.S.A.) Polidextrose (PDX)	GOS 2.9g/dia/Kg P.V. PDX 0.9g/dia/Kg P.V.	Galacto-oligossacarídeo (GOS) Polidextrose (PDX)
McVey Neufeld et al. (2019) (12)	Galactooligossacarídeos American Institute of Nutrition (AIN) 93-G (Envigo, WI, USA).	1,3g/dia/Kg P.V.	Polidextrose (PDX) Galactooligossacarídeos
Tarr et al. (2015) (15)	Sialilactose 6 Sialilactose 3 (Harlan Laboratories, Inc.)	Sialilactose 6 – 0,1g/dia/kg P.V. Sialilactose 3 – 0,1g/dia/Kg P.V.	AIN-93G diet supplemented with 6'SL or a modified AIN-93G diet supplemented with 3'SL (5% of the diet; Harlan Laboratories, Inc.)

\* Estimativa de consumo diário de prebiótico (F. P. Paiva, Maffili, & Santos, 2005).

**Tabela 2. Características dos Estudos Incluídos na Meta-análise**

Autor e Ano de Publicação	Prebiótico	Duração do Experimento	Número de Murinos, Ratos <sup>2</sup> ou Camundongos <sup>3</sup> , por Grupo	Parâmetros Analisados <sup>1</sup>
Burokas et al. (2017) (6)	Frutooligossacarídeos (FOS) e Galactooligossacarídeos (GOS) (Healy Group, Dublin, Ireland)	10 semanas	Controle = 10 <sup>3</sup> FOS = 10 GOS = 10 FOS+GOS = 10	<b>OF<sup>4</sup>; Corticosterona<sup>5</sup>; Microbiota<sup>6</sup></b> ; Peso corporal e consumo de dieta, Labirinto em cruz elevado; Teste de enterramento de mármore Teste de nado forçado; Ácido Graxo de Cadeia Curta; Expressão genica de Hipocampo e Hipotálamo (GABA, IL6, Crfr1, BDNF, MND).
Barrera-Bugueño et al. (2017) (9)	Inulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA)	2 semanas	Controle=15 <sup>2</sup> Inulina=14	<b>OF; Corticosterona</b> ; Peso corporal e consumo de água; Labirinto em Cruz Elevado; Expressão de RNAm no hipocampo 5HT-1A; Expressão de RNAm receptor no hipocampo.
De Cossío et al. (2017) (10)	Oligofrutose (OFS) (Orafti®P95)	9 semanas	Controle = 14 <sup>3</sup> G1=db/+ OFS=14 G2= db/db OFS=1	<b>OF; Corticosterona; Microbiota<sup>6</sup></b> ; Peso corporal e consumo de dieta, Labirinto em Y; Labirinto em Cruz Elevado; Caixa Claro/Escuro; IL1β; IL10; IL6; TNFα.
Mika et al. (2018) (13)	Galacto-oligossacarídeo (GOS) Polidextrose (PDX)	4 semanas	Controle = 8 <sup>2</sup> GOS + PDX = 8	<b>OF; Microbiota<sup>6</sup></b> ; Peso corporal e consumo de dieta Expressão de RNAm (BDNF, 5HT).
McVey Neufeld et al. (2019) (12)	Galactooligossacarídeos (GOS) Polidextrose (PDX)	7 semanas	Controle = 7 <sup>2</sup> GOS+PDX = 7	<b>OF; Corticosterona</b> ; Labirinto de água de Morris; Peso corporal e consumo da dieta; Expressão de RNAm (CRH-R1, BDNF, GABA).
Tarr et al. (2015) (15)	Sialilactose 6 Sialilactose 3	20 dias	Controle = 9 <sup>3</sup> Sialilactose 6 = 9 Sialilactose 3 = 9	<b>OF; Corticosterona; Microbiota<sup>6</sup></b> ; Peso corporal e consumo de dieta, Caixa claro/escuro; IL 6.

<sup>1</sup> Parâmetros primários estão descritos em negrito.<sup>2</sup> Ratos.<sup>3</sup> Camundongos.<sup>4</sup> OF: Teste de Campo Aberto.<sup>5</sup> Nível sérico de corticosterona (ng/mL).<sup>6</sup> Microbiota: quantidade cecal de *Lactobacillus* spp e *Bifidobacterium* spp [contagem de unidades formadoras de colônias (log UFC / g de fezes)].

**Tabela 3. Parâmetros Primários Incluídos em cada Estudo**

Autores/ ano de publicação	OF <sup>1</sup>	Corticosterona <sup>2</sup>	Microbiota <sup>3,4</sup>
Burokas et al. (2017) (6)	X	X	X <sup>4</sup>
Barrera-Bugueño et al. (2017) (9)	X	X	
De Cossío et al. (2017) (10)	X	X	X <sup>3</sup>
Mika et al. (2018) (13)	X		X <sup>3</sup>
McVey Neufeld et al. (2019) (12)	X	X	
Tarr et al. (2015) (15)	X	X	X <sup>4</sup>

<sup>1</sup> OF: Teste de Campo Aberto.

<sup>2</sup> Nível sérico de corticosterona (ng/mL).

<sup>3</sup> Microbiota: quantidade cecal de *Lactobacillus* spp. [contagem de unidades formadoras de colônias (log UFC / g de fezes)].

<sup>4</sup> Microbiota: abundância relativa (%) de *Bifidobacterium* spp. cecais.

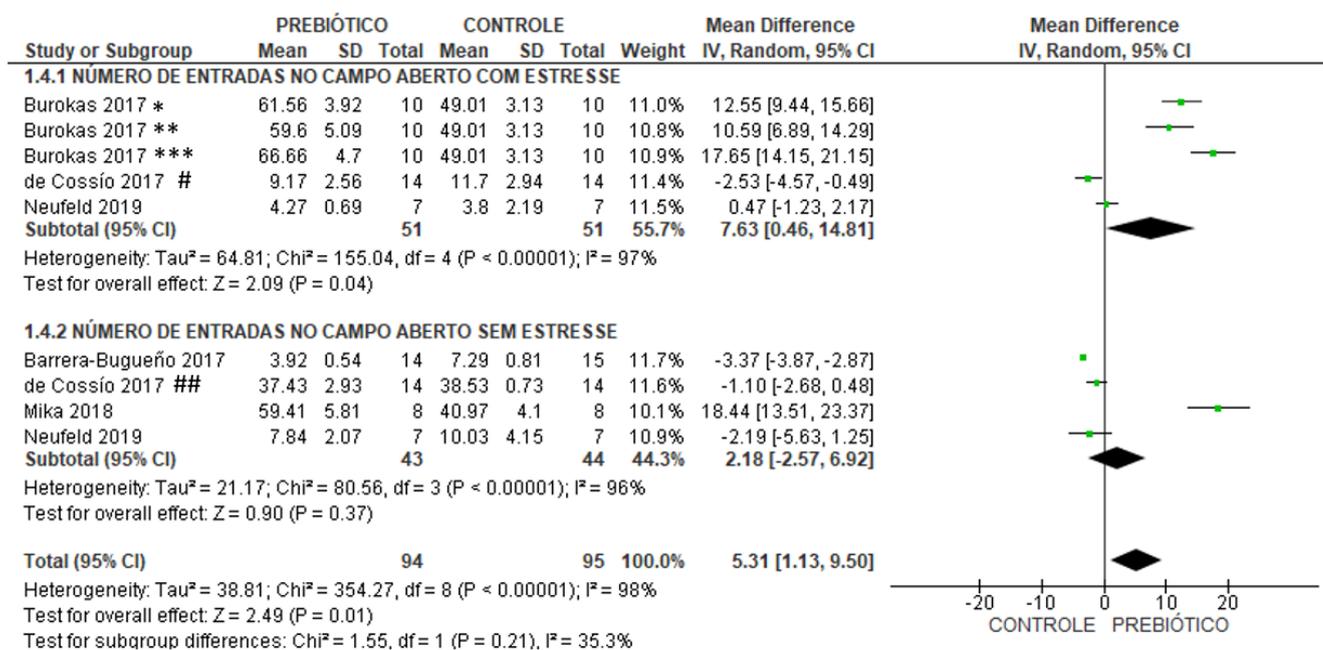
**Tabela 4 . Fatores (Elementos) caracterizados como estressores nos estudos incluídos**

Autores/ ano de publicação	R.I. <sup>1</sup>	SM <sup>2</sup>	MG <sup>3</sup>
Burokas et al. (2017) (6)	X		
Barrera-Bugueño et al. (2017) (9)			
De Cossío et al. (2017) (10)			X
Mika et al. (2018) (13)			
McVey Neufeld et al. (2019) (12)		X	
Tarr et al. (2015) (15)	X		

<sup>1</sup> R.I: Residente Intruso. <sup>2</sup>S.M: Separação Materna. <sup>3</sup>M.G: Modificação Genética

### 3.2 Eficácia da Suplementação de Prebióticos sobre os Parâmetros Primários

O teste OF consiste em duas avaliações distintas: O número de entradas dos animais no centro do campo (Figura 2) e o tempo de permanência dos animais no centro do campo (Figura 3).

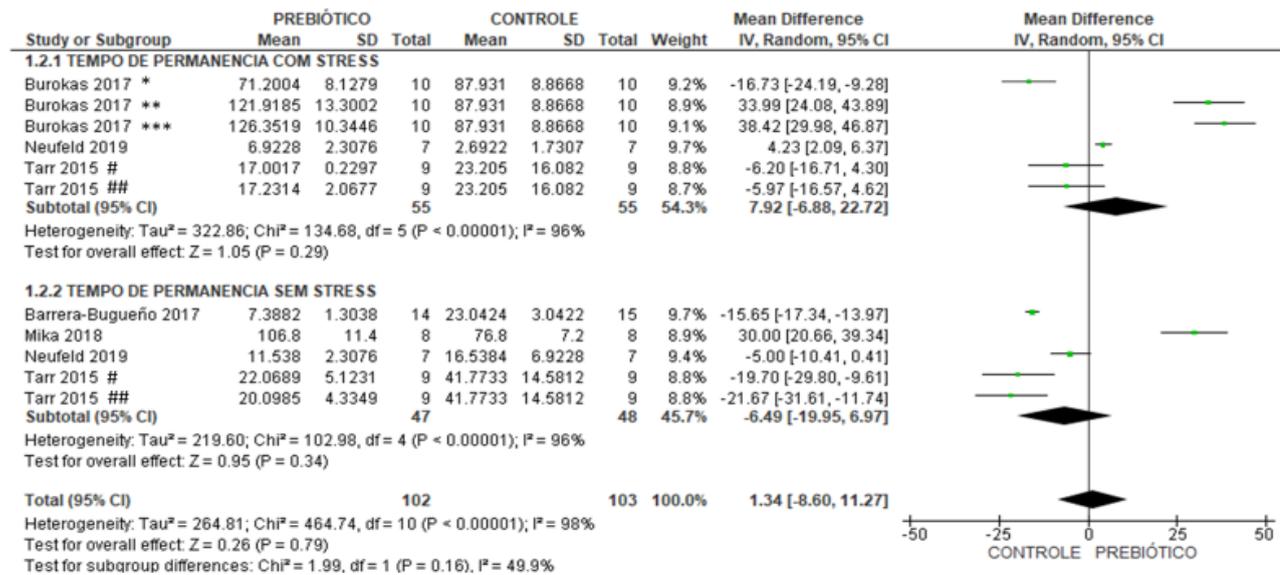


**Figura 2.** Forest Plot da comparação dos resultados da avaliação do número de entradas dos ratos no centro do Campo Aberto (com ou sem estímulo estressante). \*Prebiótico FOS; \*\*Prebiótico GOS, \*\*\*Prebiótico FOS+GOS, # (Oligofrutose) Ratos db/db : ratos geneticamente modificados; ## (Oligofrutose) Ratos db/+ : ratos sem modificação genética.

Para as avaliações, os animais foram separados em subgrupos, que receberam estímulos estressantes ou não. Neste estudo esses subgrupos foram primeiramente meta-analisados separados e em seguida, meta-analisados em conjunto.

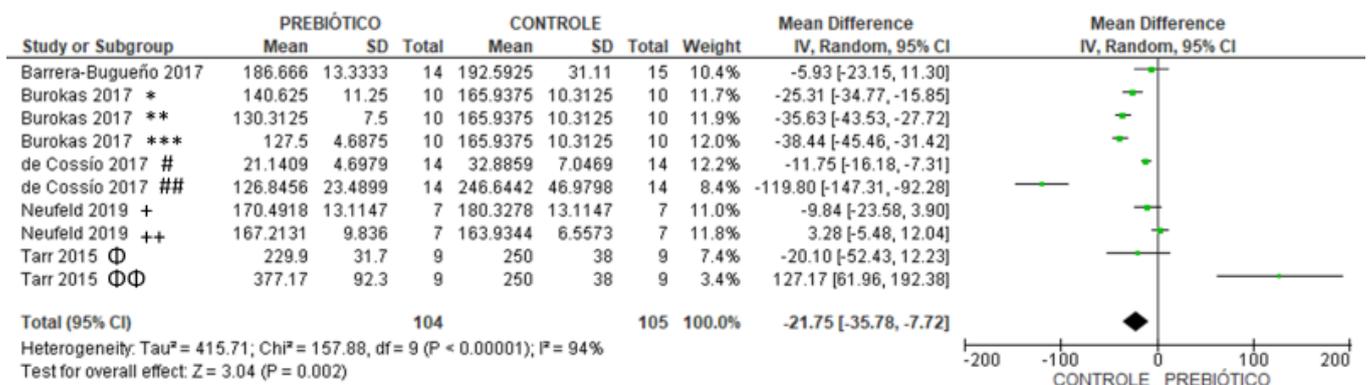
A meta-análise do número de entradas dos ratos submetidos a estímulos estressantes no centro do OF foi significativamente maior (P=0,04) no grupo prebiótico quando comparado ao grupo controle, no entanto, no subgrupo com animais não submetidos a estímulos estressantes, os resultados revelaram não existir diferença significativa (P=0,37) entre os grupos. Quando integramos os resultados dos estudos submetidos e os não submetidos a estímulo estressante, o resultado da meta-análise revelou que o desempenho dos ratos do grupo prebiótico melhorou significativamente (P=0,01) quando comparado ao

grupo controle (Figura 2).



**Figura 3.** Forest Plot da comparação dos resultados da avaliação do tempo de permanência dos ratos no centro do OF (com ou sem estímulo estressante). \*Prebiótico FOS; \*\*Prebiótico GOS, \*\*\*Prebióticos FOS+GOS, #Prebiótico Sialilactose 6, ##Prebiótico Sialilactose 3.

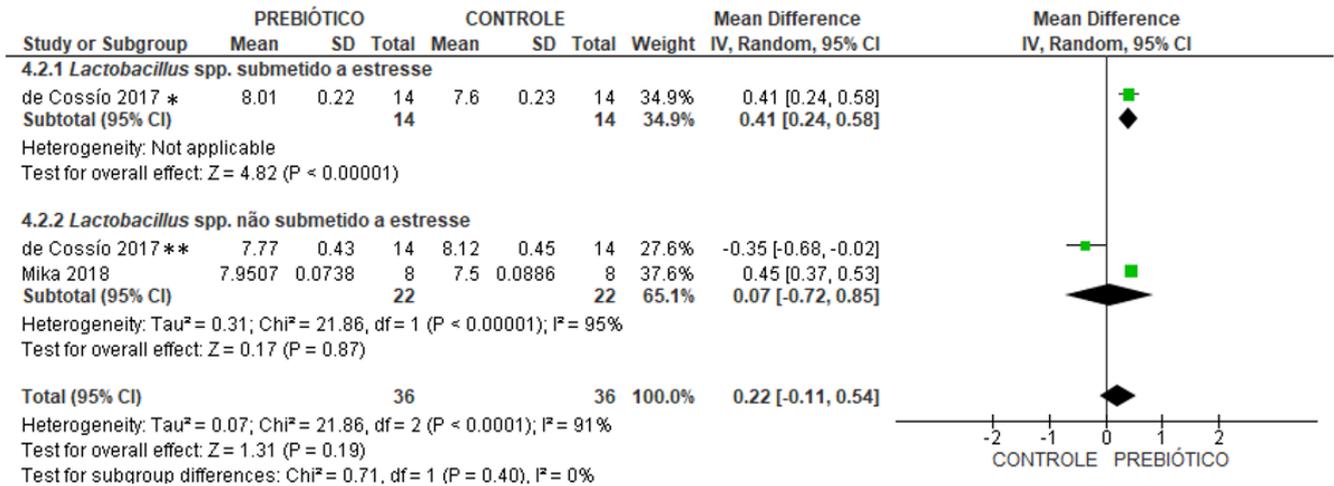
A meta-análise da comparação do tempo de permanência dos animais no centro do OF também foi dividida em subgrupos (com e sem estímulo estressante), e o resultado demonstrou não existir diferença significativa entre os grupo controle e prebiótico submetidos ao estresse (P=0,29), e não submetidos ao estresse (P=0,34). Da mesma maneira, quando integramos os resultados dos estudos, submetidos e os não submetidos a estímulo estressante, a meta-análise revelou não existir diferença significativa entre os grupos controle e prebiótico (P=0,16) (Figura 3).



**Figura 4.** Forest Plot dos efeitos dos prebióticos no nível sérico de corticosterona em ratos submetidos a estímulos estressantes. \*Prebiótico FOS; \*\*Prebiótico GOS, \*\*\*Prebiótico FOS+GOS, #(Oligofrutose) Ratos db/+, ##(Oligofrutose) Ratos db/db, +NS, ++MS, Prebiótico em ratos ΦPrebiótico Sialilactose 6, ΦΦ Prebiótico Sialilactose 3. db/+: ratos sem modificação

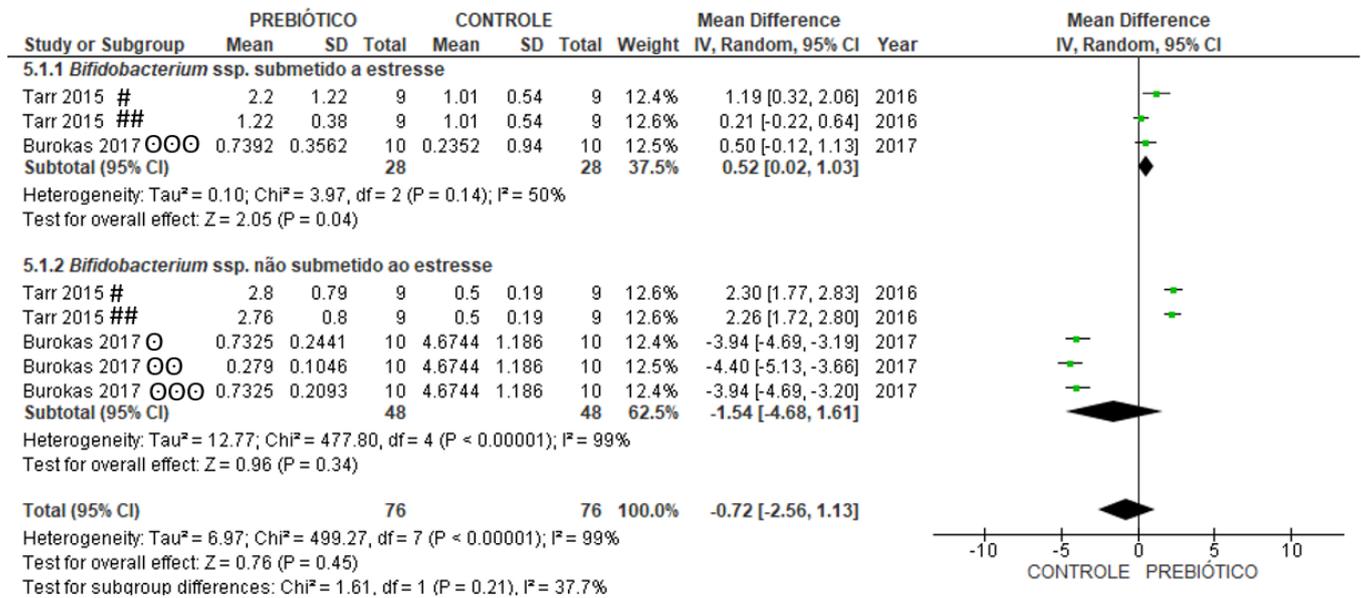
genética. db/db ratos geneticamente modificados. NS: ratos sem separação materna. MS: Ratos com separação materna.

Para a corticosterona, o resultado da meta-análise demonstrou que o nível sérico deste hormônio reduziu significativamente no grupo prebiótico, quando comparado ao grupo controle ( $P = 0,002$ ) (Figura 4).



**Figura 5.** Florest Plot que compara as quantidades médias (log de bactérias/g de conteúdo cecal) de *Lactobacillus* spp. dos grupos experimentais (Prebióticos e Controle) dos estudos incluídos. \* Oligofrutose em Ratos db/db (geneticamente modificados); \*\* Oligofrutose em Ratos db/+ (sem modificação genética).

A meta-análise na quantidade cecal de *Lactobacillus* spp. foi dividida em dois subgrupos: ratos geneticamente modificados (db/db) ou não (db/+). É possível observar que no subgrupo dos animais db/db a meta-análise aponta aumento significativo de *Lactobacillus* spp. ( $P < 0,001$ ) nos grupos que receberam prebióticos. Em contraste, nos grupos de animais db/+ não houve diferença significativa na quantidade cecal de *Lactobacillus* spp. entre os grupos ( $P = 0,87$ ). Também, a meta-análise resultante de ambos subgrupos (animais db/db e db/+) não revelou diferença significativa entre os grupos meta-analisados ( $P = 0,19$ ).



**Figura 6.** Florest Plot que compara as médias das abundâncias relativas (%) de *Bifidobacterium* spp. dos grupos experimentais (Prebióticos e Controle) submetidos ou não a estresse. # Prebiótico 6 Sialilactose, ## Prebiótico 3 Sialilactose, ○ Prebiótico FOS, ○○ Prebiótico GOS, ○○○ Prebiótico FOS+GOS.

A meta-análise das abundâncias relativas de *Bifidobacterium* spp. foi dividida em dois subgrupos: ratos submetidos a estresse e ratos não submetidos a estresse. No subgrupo dos animais submetidos a estresse a meta-análise aponta aumento significativo de *Bifidobacterium* spp. (P = 0,04) nos grupos que receberam prebióticos. Em contraste, nos grupos de animais não submetidos a estresse não houve diferença significativa na abundância relativa de *Bifidobacterium* spp. entre os grupos (P = 0,34). Também, a meta-análise resultante dos subgrupos (animais submetidos e não submetidos a estresse) não revelou diferença significativa entre os grupos meta-analisados (P = 0,45).

### 3.3 Eficácia da Suplementação de Prebióticos nos Parâmetros Secundários

Seis estudos incluídos na revisão sistemática contemplaram os parâmetros peso corporal (PC) e consumo de dieta (CD), porém não apresentaram resultados quantitativos e que permitissem a meta-análise. Segundo os estudos o peso corporal e o consumo da dieta, os resultados foram semelhantes entre os grupos controle e prebióticos (Tabela 5).

Três estudos analisaram comportamento semelhante à ansiedade pelo do teste LCE, destes, dois

estudos apontaram uma redução do comportamento de ansiedade nos animais (6,9) e um estudo não apontou redução de comportamento de ansiedade (10), quando tratados com prebióticos.

O teste LY, que avalia o desenvolvimento da estrutura do hipocampo, não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (10). Em contraste, observou-se melhora significativa na aprendizagem e memória espacial no grupo tratado com prebióticos e submetidos ao teste de LAM (12). Os prebióticos causaram também atenuação do estresse, redução do número de defecações e melhora da mobilidade nos animais quando submetidos ao teste NF (6).

No teste da CCE, observou-se uma redução do comportamento de ansiedade (15), porém outro estudo com duração de nove semanas a suplementação com prebiótico não reduziu significativamente este comportamento. No teste de EM a suplementação demonstrou causar a redução do comportamento de ansiedade, e interferiu significativamente nas concentrações de SCFA, aumentando as concentrações do acetato e propionato cecal e reduzindo isobutirato (6).

Dois estudos investigaram o efeito da suplementação dos prebióticos no número de receptores GABA e as suas subunidades, sendo que um deles não observou-se melhora significativa (12) e o outro relatou aumento significativo da quantidade destes receptores no hipocampo (6).

A suplementação de prebióticos reduziu a quantidade de CRFR1 e da subunidade do receptor NMDA (6), não alterou os níveis das interleucinas IL-1, IL-6 e o TNF $\alpha$  hipocampal (10,15) e aumentou os níveis de IL-10 hipotalâmicos (10).

**Tabela 5.** Parâmetros secundários incluídos em cada estudo

Parâmetros Avaliados*	Estudos					
	Burokas et al. (2017)	Barrera-Bugueno et al. (2017)	De Cossío et al. (2017)	Mika et al. (2018)	McVey Neufeld et al. (2019)	Tarr et al. (2015)
PC	X	X	X	X	X	X
CD	X	X	X	X	X	X
LCE	X	X	X			
LY			X			
LAM					X	
NF	X					
CCE			X			X
EM	X					
SCFA	X					
GABA	X				X	
BDNF	X			X	X	
CRFR1	X					
NMDA	X					
IL 1			X			
IL 6	X		X			X
TNF $\alpha$			X			
IL 10	X		X			

\* PC- Peso Corporal, CD- Consumo de Dietas; LCE- Labirinto em Cruz Elevado ; LY- Labirinto em Y, LAM-Labirinto de Água de Morris, NF-teste de Nado Forçado, CCE-Caixa Claro/Escuro, EM – teste de Enterramento de Mármore; SCFA- Ácido Graxo de Cadeia Curta; GABA- Receptores Ácido Gama Amino Butírico; BDNF- Fator Neurotrófico de Derivado do Cérebro; CRFR1: Receptor 1 do Fator de Liberação de Corticotrofina; NMDA: Receptor N-methyl-D-aspartato. IL-Interleucina; TNF $\alpha$ - Fator Neurotrófico Tumoral.

#### 4 DISCUSSÃO

O transtorno de ansiedade generalizada é altamente prevalente e incapacitante, que resulta no comprometimento do funcionamento físico, psicológico e social diário, com perda em produção

econômica (20). Os tratamentos podem incluir intervenções psicológicas, intervenções farmacológicas ou uma combinação dessas modalidades e a terapia farmacológica é tipicamente o tratamento de primeira linha (3,4).

A percepção de que o eixo da microbiota-intestino-cérebro desempenha um papel crítico na saúde e na doença, incluindo distúrbios neuropsiquiátricos, está avançando rapidamente. Alimentar uma microbiota intestinal com prebióticos, como frutooligosacarídeos (FOS) e galacto-oligosacarídeos (GOS), é uma manipulação atraente, porém pouco investigada da microbiota, assim como tratamento modelador do comportamento em todos os domínios relevantes para ansiedade (6). Estudos em ratos demonstraram que a suplementação de prebióticos na dieta de ratos, FOS, GOS e PDX, apoia o desenvolvimento cerebral, aumenta a plasticidade e altera a atividade em regiões do cérebro importantes para a cognição e a regulação emocional, sendo capaz de modificar marcadamente comportamentos e química cerebral, relevantes para a ansiedade (6,13).

Os resultados desta metanálise demonstraram os efeitos de compostos prebióticos em um modelo experimental de avaliação de parâmetros associados à mudança de comportamento: teste de Campo Aberto, nível sérico de corticosterona e a mudança do perfil da microbiota (quantidade cecal de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.). Outros parâmetros foram considerados nesta revisão, classificados como secundários, não foram incluídos na metanálise. Acreditamos que este estudo colabore e estimule a realização de trabalhos em humanos usando os prebióticos associados à terapia convencional ou não com objetivo de melhorar as opções de tratamento.

De uma ampla gama de estudos, sistematicamente pesquisados e selecionados, usando critérios estritos de inclusão e exclusão, foi incluído um pequeno número nessa meta-análise. Este rigor refere-se à metodologia utilizada pelos pesquisadores em cada estudo, que são determinantes para o resultado final da meta-análise, visando elevar o nível de confiança (21).

#### **4.1 Parâmetros Primários**

Nos ratos jovens, entre 21 a 63 dias de vida, utilizados nos estudos meta-analisados, os comportamentos de ansiedade, déficits cognitivos como memória e aprendizagem tem forte ligação com a

neurogênese, e com neurônios imaturos (22). A suplementação de prebióticos pode modular benéficamente a microbiota do hospedeiro, aumentando a quantidade de microrganismos com função probiótica (6). Isoladamente os probióticos demonstraram melhorar de forma convincente as funções comportamentais prejudicadas por agentes estressores em ratos jovens (23). Além disso, dietas suplementadas com prebióticos, têm revelado efeitos neurocomportamentais que podem através de indicadores de comportamento (teste OF), serem utilizados para a avaliação da ansiedade (12). Em ratos, como modelo experimental, o teste OF pode avaliar comportamento semelhante à ansiedade em humanos (6,9,10,12,13,15). Para efeito de interpretação, o comportamento de ansiedade provoca um menor número de entradas e menor tempo de permanência do animal no centro do OF (24).

Nesse estudo, os resultados dos trabalhos foram meta-analisados por meio de dois parâmetros: contagem do número de entradas e tempo de permanência no centro do OF (6,9,10,12,13,15) e os resultados das meta-análises revelaram que o grupo de animais submetidos às dietas com prebióticos melhorou o comportamento semelhante a ansiedade, quando comparados ao grupo controle, por apresentarem um número maior de entradas no centro do OF, apesar de o tempo de permanência no centro do OF não ter mostrado diferença entre os grupos suplementados com prebiótico e controle.

A redução observada do comportamento semelhante à ansiedade, teste de OF, induzida pela dieta com prebióticos em ratos jovens, pode ser decorrente das diminuições na expressão do c-fos mRNA na amígdala e aumento simultâneo nos c-fos mRNA e marcadores de plasticidade no córtex pré-frontal. Em animais nessa faixa etária, a suplementação contendo prebióticos e frações bioativas do leite podem levar a alterações adaptativas nos genes dos circuitos neurais subjacentes à regulação da emoção e diminuir o comportamento relacionado à ansiedade (13), uma vez que o SNC ainda está em maturação (25), entretanto esses mesmos resultados não ocorrem em ratos adultos (26). Porém, em camundongos com alterações metabólicas indicativas de ansiedade, a dieta com prebióticos falhou em demonstrar melhora nos efeitos ansiolíticos, déficits de memória espacial e neurogênese hipocampal (10).

Ratos que exibiam diminuição de BDNF no hipocampo foram associados a comportamentos semelhante a ansiedade, e a administração de FOS+GOS demonstrou nesses animais altos níveis de expressão de BDNF no hipocampo (6).

A meta-análise do nível sérico de corticosterona mostrou que os grupos suplementados com prebiótico tiveram uma redução dos níveis plasmáticos desse glicocorticoide, quando comparados aos grupos controle (6,9,15), devido ao efeito benéfico da suplementação na atividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) (9). A redução da corticosterona está presente e diretamente relacionada a melhora de comportamentos de ansiedade, principalmente quando associada a situações de estresse (27), assim como diminuição das citocinas pró-inflamatória IL-1 e IL-6 e normalização dos efeitos do estresse na microbiota (6). Porém, mesmo sem alterar benéficamente os níveis plasmáticos de corticosterona, os prebióticos 3'sialyllactose e 6'sialyllactose, demonstraram efeito ansiolítico (15). Quando os níveis plasmáticos de corticosterona estão aumentados, estes reprimem a expressão de mRNA de 5-HT1A, ativando o sistema ubiquitina-proteossoma, acarretando desordem cerebral, levando à perda de funções mentais, como a memória e a aprendizagem (9,28,29).

Neste estudo, as meta-análises da abundância relativa de *Bifidobacterium* spp. e o das quantidades médias (log de bactérias/g de conteúdo cecal) de *Lactobacillus* spp. revelaram que em murinos expostos a diferentes situações de estresse, os prebióticos demonstraram serem capazes de modificar benéficamente a microbiota intestinal. A exposição ao estresse afeta negativamente a estrutura das comunidades microbianas associadas à mucosa (30-32). Estudo utilizando a suplementação de prebióticos, FOS + GOS, observou redução significativa dos feitos deletérios na microbiota induzida pelo estresse psicossocial crônico (6). Em grupos não submetidos a estresse não observamos diferença significativa entre os subgrupos analisados. É provável que este resultado seja devido a alterações na composição da microbiota, especialmente o aumento da abundância relativa de outras bactérias benéficas a fisiologia colônica, como *Akkermansia* e *Bacteroides* (6). Porém, sugerimos que novos estudos randomizados sejam feitos para explicar esses resultados contraditórios entre os grupos estressados e não estressados.

A microbiota intestinal e seu perfil de biodiversidade influenciam significativamente o comportamento, mudanças neuroquímicas e imunológicas e que são relevantes para transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse (33), assim como comportamentos de ansiedade (6,34,35). O estresse crônico, bem como ansiedade reduz a concentração de bifidobactérias e lactobacilos e, assim como altera o equilíbrio microbiano intestinal, a administração de prebióticos impede esta mudança adversa (6,36). O

desequilíbrio microbiano intestinal, definido como disbiose, pode ser decorrente de um distúrbio na própria microbiota, alterações na composição funcional e nas atividades metabólicas ou na distribuição local, resultante da perda de organismos benéficos, crescimento excessivo de organismos potencialmente prejudiciais e perda da diversidade microbiana geral, de maneira combinada ou isolada (37) e que podem influenciar a química e o comportamento cerebral (38). Além disso, a disbiose, assim como a inflamação intestinal foram ligadas a várias causas de doenças mentais, incluindo ansiedade, que é predominante na sociedade atual e dietas com alimentos funcionais têm sido reconhecidos como terem a capacidade de restaurar o equilíbrio microbiano normal (39), e, portanto, terem papel potencial no tratamento e prevenção da ansiedade (40). Essas evidências reforçam o papel benéfico dos prebióticos e seus efeitos sobre o eixo microbiota- intestino -cérebro na saúde do hospedeiro sob condições de estresse, pois apoiam o recente alargamento da definição de psicobióticos, para incluir estratégia de tratamento baseada no uso de prebióticos. Os psicobióticos foram previamente definidos como bactérias vivas (probióticos) que, quando ingeridas, conferem benefícios à saúde mental por meio de interações com bactérias intestinais comensais. Expandimos essa definição para abranger prebióticos, que aumentam o crescimento de bactérias intestinais benéficas (41).

Estudos demonstraram que quando administrados por via oral, os *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. induziram alterações na composição da microbiota intestinal de ratos, bem como na modulação benéfica do eixo HHA, mitigando o desenvolvimento de transtornos associados a ansiedade (30,42). Além disso, melhoram o comportamento neurológico e as anormalidades no desenvolvimento e metabolismo intestinal e recolonização microbiana (43,44). Quando a suplementação desses microrganismos probióticos foi combinada com os prebióticos frutoligossacarídeos (FOS) e galactoligossacarídeos (GOS), observou-se uma ampla estimulação bacteriana da microbiota, assim como aumento dos seus efeitos benéficos (6).

A capacidade ansiolítica dos prebióticos relaciona-se diretamente com a microbiota intestinal, pois os SCFAs, acetato, propionato e butirato, produzidos por microrganismos benéficos, probióticos, que se alimentam dos alimentos funcionais, principalmente prebióticos, impedem efeitos deletérios no comportamento, na liberação de citocinas e alterações patológicas na microbiota intestinal (6). Além disso,

os SCFAs são moléculas que influenciam a maturação, morfologia e função da micróglia e a sua produção pode ser modulada por uma microbiota saudável (6,34,35), contribuindo para o desenvolvimento de células T reguladoras do cólon (Tregs) e que limitam a inflamação local no intestino, bem como envolvem o receptor acoplado à proteína G GPR43 em neutrófilos para diminuir sua infiltração nos tecidos e, portanto, mitigar o processo inflamatório (45). Embora os mecanismos anti-inflamatórios da fibra alimentar ainda não tenham sido elucidados, os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) podem ser um fator contribuinte (46,47).

## 4.2 Parâmetros Secundários

As intervenções com prebióticos não tiveram efeitos sobre parâmetros relacionados ao aumento do PC dos animais, e nem sobre o CD nos estudos incluídos nessa meta-análise (6,9,10,12,13,15). Vários resultados apóiam a relevância da fermentação prebiótica no manejo do apetite em alimentos saudáveis, porém não observaram alteração na ingestão alimentar de dietas suplementadas com prebióticos em ratos (48,49) e humanos (50,51). Já em roedores obesos ou com sobrepeso, os prebióticos demonstraram auxiliar no controle do peso, pela diminuição da ingestão de alimentos (52).

Outros parâmetros, aqui tidos como secundários: alterações hormonais, mudanças em expressão gênica, sinais de neuroplasticidade cerebral em regiões corticais, hipocampo e amígdala, que, foram conferidos em testes de comportamento, avaliações bioquímicas e histológicas, corroboram os efeitos benéficos do uso de suplementação com prebióticos observados nos parâmetros indicativos de comportamentos de ansiedade (6,9,10,12,15,53).

Outros testes de comportamento, LCE, LY, LAM, TNF, CCE, TEM, foram considerados secundários e também evidenciaram efeitos benéficos da suplementação de prebióticos na dieta de ratos, como modelo animal (6,9,10,12,15). Em relação aos níveis de ansiedade medidos em LCE, a administração de diferentes prebióticos demonstraram respostas diferentes (6,9,10). A suplementação de inulina não alterou benéficamente a porcentagem de tempo gasto no teste LCE em relação ao grupo controle, porém, houve um benefício em porcentagem de entradas no LCE (6). Barrera-Bugueño et al. (2017) (9) e De Cossío et al. (2017) (10) não observaram diferença em relação ao número de entradas e

tempo gasto no LCE em ratos tratados com os prebióticos inulina ou FOS. Porém, os animais suplementados com a combinação de FOS + GOS demonstrou levar a uma resposta aditiva benéfica nos transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse, pois levou a uma gama mais ampla de estimulação bacteriana (6).

Outros parâmetros secundários utilizados nesta meta-análise foram os testes EM e TNF e demonstraram que a suplementação com prebióticos, FOS, GOS e FOS + GOS, teve efeitos benéficos (6).

No teste LY e que avaliam pelos testes comportamentais a noção espacial e memória (54), a suplementação de prebióticos não demonstrou efeitos benéficos (10). Porém, no teste LAM, considerado um teste robusto e confiável e fortemente correlacionado com a plasticidade sináptica do hipocampo para memória espacial, mostrou que ratos suplementados com prebióticos tiveram melhores resultados que os animais do grupo controle (12).

No teste de comportamento da CCE, usado em farmacologia para testar respostas incondicionais de ansiedade em roedores e que normalmente passam mais tempo no compartimento escuro, do que no compartimento claro (55), a suplementação com prebiótico, FOS, não resultou em efeito ansiolítico (10). Porém, em camundongos expostos ao estresse e alimentados com prebióticos 3'SL ou 6'SL, tiveram um aumento do tempo gasto na zona clara (15).

Alterações na expressão gênica e aumento de SCFAs nas fezes de ratos suplementados com FOS e GOS se relacionaram com diminuição no comportamento de ansiedade verificados nos testes de comportamento de OF, TEM e LCE (6,53). Esses resultados benéficos estão associados à ação de prebióticos e probióticos, classificados como psicobióticos, que modificam benéficamente a microbiota e aumentam a produção de SCFAs, que são uma importante fonte de energia, em conjunto com o ácido láctico (41,56), assim como demonstraram, FOS e GOS, aumentar o acetato cecal e propionato e reduzir as concentrações de isobutirato em ratos com comportamento de ansiedade (6). Outro prebiótico, a sialilactose, também foi capaz de reduzir o comportamento semelhante à ansiedade em ratos após estresse crônico (15).

Os SCFAs produzidos pelo metabolismo das bactérias benéficas da microbiota intestinal, demonstraram reduzir o pH do cólon e inibir o crescimento de microrganismos não benéficos (57), assim

como realizam a diferenciação e maturação de células no hospedeiro e modulam a expressão de genes (58,59) e podem ter múltiplos efeitos, incluindo a modulação e secreção de serotonina enteroendócrina (60). Além disso, interagem com células enteroendócrinas da mucosa intestinal e catalisam a liberação de hormônios intestinais, como a colecistocinina (CCK), do peptídeo YY (PYY) e o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) (41).

Os prebióticos podem ter efeitos mais fortes nesse sentido em comparação aos probióticos. SCFAs e hormônios intestinais entram em circulação e podem migrar para o sistema nervoso central. Os psicobióticos aumentam a produção de neurotransmissores no intestino, incluindo dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e ácido g-aminobutírico (GABA), que provavelmente modulam a neurotransmissão nas sinapses proximais do sistema nervoso entérico. O nervo vago sinapsa nos neurônios entéricos e permite a comunicação intestino-cérebro (61). A ação psicobiótica restaura a função da barreira intestinal e diminui as concentrações circulantes de glicocorticóides e citocinas pró-inflamatórias. Eles também aumentam as concentrações de citocinas anti-inflamatórias, a integridade da barreira hematoencefálica e a barreira intestinal e reduzem a inflamação geral. As citocinas agrupadas no cérebro representam a interação das citocinas com a barreira hematoencefálica. As citocinas podem interagir mais diretamente com o cérebro do que o anteriormente apreciado pelos vasos linfáticos centrais recentemente descobertos (41).

Estudos observaram um aumento dos receptores GABA no SNC de animais suplementados com prebióticos e submetidos a estresse (6,12). A relação sinérgica entre prebióticos e probióticos pode aumentar a produção de metabólitos chamados pós-bióticos, que estão ganhando crescente importância devido às suas funções benéficas no trato gastrointestinal e à sua influência em diferentes órgãos e tecidos. Entre os pós-bióticos, destaca-se o GABA, que desempenha um papel essencial na prevenção de doenças neurais. Geralmente, o GABA é produzido por bactérias ácido lácticas, que sob certas condições podem produzir uma grande quantidade desse aminoácido (62) e que é considerado um importante neurotransmissor inibitório (63). O efeito inibitório do GABA ocorre como resultado da ligação ao sistema receptor GABAérgico composto por três receptores específicos: GABA-A, GABA-B e GABA-C (64). Por

meio desses receptores, o GABA pode modular o humor, distúrbios do sono, memória espacial e temporal (65).

Diversos eventos no SNC são investigados com o uso de prebióticos, dentre eles a neurogênese através da expressão de genes no hipocampo. A administração de FOS, GOS e FOS + GOS (6), PDX + GOS (12) e PDX + GOS (53) em murinos aumentou significativamente a expressão hipocampal do BDNF, o que se relaciona com redução dos comportamentos de ansiedade (6). A microbiota tem sido proposta como um elemento essencial no desenvolvimento do cérebro, pois acredita-se ativar a secreção de BDNF através da produção de butirato e a sua modulação ser feita por suplementação com prebióticos e probióticos (66). O BDNF é um fator de crescimento de uma família única de 50 fatores de crescimento de polipeptídeos que influenciam a proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte de células neuronais e não neuronais. Outros fatores neurotróficos, como FCN (fator de crescimento nervoso), NT-3 (neurotrofina-3) e NT-4 (neurotrofina-4) também são essenciais para a saúde e bem-estar do sistema nervoso e mediam em atividades de ordem superior, como aprendizado, memória e comportamento, além de sua intervenção na sobrevivência celular. Alterações nos níveis de neurotrofinas têm sido relacionadas a 55 distúrbios neurodegenerativos e também distúrbios psiquiátricos (67,68).

A suplementação de prebióticos indicou níveis aumentados de receptores NMDA no cérebro de murinos (6,12,53), o que também foi evidenciado por Gronier et al. (2018) (69) , porém utilizando o prebiótico B-GOS. Além disso, evidenciou aumento dos níveis plasmático de acetato, subunidades GluN2B corticais e mRNA da acetil-Co-A carboxilase, demonstrando efeito pró-cognitivo da suplementação do alimento funcional. Porém, o papel do acetato circulante derivado da fermentação bacteriana intestinal desse prebiótico requer uma investigação mais aprofundada.

As administrações de GOS e FOS + GOS reduziram benéficamente os níveis de mRNA do receptor 1 do fator de liberação de corticotropina (CRFR1) (6). O fator de liberação de corticotropina (CRF) desempenha um papel central e bem estabelecido na ativação do eixo HHA em condições basais e de estresse, tendo papel crucial na manutenção da homeostase, nas respostas do sistema endócrino e atividade comportamental (70) e está implicada na etiologia de várias patologias psicológicas (71). Além

disso, o CRF promove a inflamação estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e proteína inflamatória 1a dos macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ) das células imunes no GI (72-74).

A suplementação do prebiótico OFS resultou no aumento dos níveis plasmáticos da citocina anti-inflamatória IL-10 em camundongos (10). Prebióticos, como moléculas de cadeia curta, mais abundantes nos frutanos do tipo inulina I e II, distorcem a proporção IL-10 / IL-12 nas células mononucleares do sangue periférico mais na direção da IL-10 e, portanto, induzem um equilíbrio mais anti-inflamatório (75).

Os prebióticos FOS+GOS além de modificarem a comunidade microbiana, promoveram o aumento do peso cecal e o número total de bactérias, levando a níveis mais altos de SCFA, reduzindo a liberação dessas citocinas IL-1, IL-6 e TNF (6,10), que provocam comportamentos de ansiedade (40), porém em outro estudo, a interleucina IL-6 estava associada a maiores abundâncias de bactérias no gênero *Coprococcus* (76).

Alguns parâmetros para avaliação dos efeitos da suplementação com prebióticos não foram meta-analisados devido à heterogeneidade de apresentação de dados em cada estudo.

### 4.3 Avaliação de Risco de Viés

Neste trabalho de revisão sistemática, selecionamos seis estudos que preencheram os critérios de inclusão. Dentre os trabalhos primários eleitos para as meta-análises, três descreveram a seleção dos animais como randomizada e dois relataram cegamento dos avaliadores que realizaram as análises. Acreditamos que estes cuidados metodológicos aumentam a qualidade dos resultados primários de cada estudo e reduz o risco desses vieses.

Não obstante ao rigor, incluímos estudos com resultados positivos e / ou negativos quando se referem aos benefícios do uso de prebióticos no comportamento semelhante à ansiedade.

Além disso, o número de estudos incluídos com base nos critérios de inclusão e exclusão pode ser um fator limitante, pois dos três parâmetros primários selecionados apenas em dois estudos os três estavam presentes e nos demais encontramos dois parâmetros primários para análise. Alguns parâmetros importantes nos efeitos do comportamento de ansiedade não foram meta-analisados devido ao formato da apresentação dos dados, que impossibilitaram uma análise quantitativa. Embora os estudos tenham sido

cuidadosamente selecionados com observância da relevância para o objetivo da pesquisa, os tipos de prebióticos diferiram nos estudos, e acreditamos que esse fator foi decisivo colaborador na heterogeneidade dos resultados, o que não diminui a importância do resultado global da avaliação dos efeitos, cujas meta-análises demonstraram os benefícios dos prebióticos e seu efeito ansiolítico no comportamento dos animais estudados, visto que, os resultados apresentados mostram que a suplementação com prebióticos é capaz de reduzir o comportamento semelhante a ansiedade, e esta mudança comportamental tem relação com a redução dos níveis plasmáticos de corticosterona e com o aumento do número de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, benéficas ao hospedeiro.

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso de prebióticos tem efeitos benéficos em indicadores de comportamento de ansiedade em murinos machos, redução dos níveis de corticosterona e ao aumento da população de bactérias benéficas, *Lactobacillus* ssp. e *Bifidobacterium* ssp., apesar dos poucos estudos incluídos nas análises. Abordar essa limitação é um importante caminho para pesquisas futuras utilizando prebióticos como alternativa terapêutica ou terapia complementar ao tratamento convencional dos comportamentos ansiosos, tendo em vista que a microbiota benéfica e sua conexão com regiões cerebrais reconhecidas como moduladoras de emoções e de resposta neuroendócrina ao estresse podem estar subjacentes à fisiopatologia da ansiedade.

## AGRADECIMENTOS E DIVULGAÇÕES

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, Brasil. Porém não tiveram nenhum envolvimento no desenho do estudo, na coleta, análise ou interpretação de dados, na redação do manuscrito, ou na decisão de publicar os resultados.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Contribuições do autor. W.G.A.O., H.B.N e M.N.R. projetaram a pesquisa, analisaram os dados e escreveram o manuscrito. H.R.S.C., L.J.C.F. e S.N. realizaram a pesquisa bibliográfica. M.N.R. conduziu a análise estatística. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

## FINANCIAMENTO

Não houve financiamento direto para este estudo. Todos os autores não relatam interesses financeiros ou potenciais conflitos de interesse.

## INFORMAÇÃO SOBRE O ARTIGO

Do Departamento de Ciências Funcionais, Faculdade de Medicina da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência Hermann Bremer Neto, Ph.D., Departamento de Ciências Funcionais, Faculdade de Medicina da Universidade do Oeste Paulista, Rua José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil, CEP 19050-920; E-mail: hermann@unoeste.br

## 6 REFERÊNCIAS

1. Yue J-L, Liu H, Li H, Liu J-J, Hu Y-H, Wang J, et al. (2020): Association between ambient particulate matter and hospitalization for anxiety in China: A multicity case-crossover study. *Int J Hyg Environ Health* 223: 171–178.
2. Kazemi A, Noorbala AA, Azam K, Djafarian K (2019): Effect of prebiotic and probiotic supplementation on circulating pro-inflammatory cytokines and urinary cortisol levels in patients with major depressive disorder: A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial. *J Funct Foods* 52: 596–602.
3. Bandelow B, Reitt M, Röver C, Michaelis S, Görlich Y, Wedekind D (2015): Efficacy of treatments for anxiety disorders: a meta-analysis. *Int Clin Psychopharmacol* 30: 183–192.
4. Bandelow B, Michaelis S, Wedekind D (2017): Treatment of anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci* 19: 93–107.
5. Dinan TG, Cryan JF (2012): Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1369–1378.

6. Burokas A, Arboleya S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G, et al. (2017): Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biol Psychiatry* 82: 472–487.
7. Tremellen K (2016): Gut Endotoxin Leading to a Decline IN Gonadal function (GELDING) - a novel theory for the development of late onset hypogonadism in obese men. *Basic Clin Androl* 26: 7.
8. Bravo JA, Forsythe P, Chew M V., Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. (2011): Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci* 108: 16050–16055.
9. Barrera-Bugueño C, Realini O, Escobar-Luna J, Sotomayor-Zárata R, Gotteland M, Julio-Pieper M, Bravo JA (2017): Anxiogenic effects of a Lactobacillus, inulin and the synbiotic on healthy juvenile rats. *Neuroscience* 359: 18–29.
10. de Cossío LF, Fourrier C, Sauvant J, Everard A, Capuron L, Cani PD, et al. (2017): Impact of prebiotics on metabolic and behavioral alterations in a mouse model of metabolic syndrome. *Brain Behav Immun* 64: 33–49.
11. McVey Neufeld K-A, O’Mahony SM, Hoban AE, Waworuntu R V., Berg BM, Dinan TG, Cryan JF (2019): Neurobehavioural effects of Lactobacillus rhamnosus GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galactooligosaccharide in male rats exposed to early-life stress. *Nutr Neurosci* 22: 425–434.
12. Tarr AJ, Galley JD, Fisher SE, Chichlowski M, Berg BM, Bailey MT (2015): The prebiotics 3’Sialyllactose and 6’Sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: Evidence for effects on the gut–brain axis. *Brain Behav Immun* 50: 166–177.
13. Mika A, Gaffney M, Roller R, Hills A, Bouchet CA, Hulen KA, et al. (2018): Feeding the developing brain: Juvenile rats fed diet rich in prebiotics and bioactive milk fractions exhibit reduced anxiety-related behavior and modified gene expression in emotion circuits. *Neurosci Lett* 677: 103–109.
14. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. (2017): Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14: 491–502.
15. Szklany K, Wopereis H, de Waard C, van Wageningen T, An R, van Limpt K, et al. (2019): Supplementation of dietary non-digestible oligosaccharides from birth onwards improve social and reduce anxiety-like behaviour in male BALB/c mice. *Nutr Neurosci* 1–15.
16. Foster JA, McVey Neufeld KA (2013, May): Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, vol. 36. pp 305–312.
17. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG (2010): Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *Int J Surg* 8: 336–341.

18. Hozo SP, Djulbegovic B, Hozo I (2005): Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. *BMC Med Res Methodol* 5: 13.
19. Paiva FP, Maffili V, Santos ACS (2005): Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Salvador. Retrieved from [www.bioteriocentral.ufc.br](http://www.bioteriocentral.ufc.br) > arquivos > apostila\_manipulacao
20. Slee A, Nazareth I, Bondaronek P, Liu Y, Cheng Z, Freemantle N (2019): Pharmacological treatments for generalised anxiety disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet* 393: 768–777.
21. Figueiredo DB, Paranhos R, Silva JA da, Rocha EC da, Alves DP (2014): O que é, para que serve e como se faz uma meta-análise? *Teor e Pesqui* 23: 205–228.
22. Revest J-M, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza P-V, Abrous DN (2009): Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry* 14: 959–967.
23. Hadizadeh M, Hamidi GA, Salami M (2019): Probiotic supplementation improves the cognitive function and the anxiety-like behaviors in the stressed rats. *Iran J Basic Med Sci* 22: 506–514.
24. Kleinridders A, Cai W, Cappellucci L, Ghazarian A, Collins WR, Vienberg SG, et al. (2015): Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proc Natl Acad Sci* 112: 3463–3468.
25. Loizou LA (1972): The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat. *Brain Res* 40: 395–418.
26. Murrin CL, Sanders JD, Bylund DB (2008): Comparison of the Maturation of the Adrenergic and Serotonergic Neurotransmitter Systems in the Brain: Implications for Differential Drug Effects on Juveniles and Adults. *Biochem Pharmacol* 73: 1225–1236.
27. Skórzewska A, Lehner M, Wisłowska-Stanek A, Krzańcik P, Ziemia A, Płaźnik A (2014): The effect of chronic administration of corticosterone on anxiety- and depression-like behavior and the expression of GABA-A receptor alpha-2 subunits in brain structures of low- and high-anxiety rats. *Horm Behav* 65: 6–13.
28. Myung J, Kim KB, Crews CM (2001): The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev* 21: 245–273.
29. Braun TP, Marks DL (2015): The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Front Physiol* 6: 12.
30. Watanabe Y, Arase S, Nagaoka N, Kawai M, Matsumoto S (2016): Chronic Psychological Stress Disrupted the Composition of the Murine Colonic Microbiota and Accelerated a Murine Model of Inflammatory Bowel Disease ((M. Chamailard, editor)). *PLoS One* 11: e0150559.
31. O’Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, Codling C, Ceolho A-M, Quigley EMM, et al. (2009): Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses. *Biol Psychiatry* 65: 263–267.

32. Arrieta M, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B (2014): The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. *Front Immunol* 5: 1–18.
33. Moloney RD, Desbonnet L, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF (2014): The microbiome: stress, health and disease. *Mamm Genome* 25: 49–74.
34. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. (2015): Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18: 965–977.
35. Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, et al. (2015): The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience* 300: 141–154.
36. Aizawa E, Tsuji H, Asahara T, Takahashi T, Teraishi T, Yoshida S, et al. (2016): Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *J Affect Disord* 202: 254–257.
37. DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E (2016): Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis* 22: 1137–1150.
38. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. (2011): The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotropic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology* 141: 599-609.e3.
39. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA (2019): Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16: 605–616.
40. Clapp M, Aurora N, Herrera L, Bhatia M, Wilen E, Wakefield S (2017): Gut microbiota's effect on mental health: the gut-brain axis. *Clin Pract*. <https://doi.org/10.4081/cp.2017.987>
41. Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ (2016): Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. *Trends Neurosci* 39: 763–781.
42. O'Mahony L, Mccarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, et al. (2005): Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 128: 541–551.
43. Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, et al. (2011): Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci* 108: 3047–3052.
44. Kao ACC, Harty S, Burnet PWJ (2016): The Influence of Prebiotics on Neurobiology and Behavior. *International Review of Neurobiology*, vol. 131. Elsevier Inc., pp 21–48.
45. Zeng MY, Inohara N, Nuñez G (2017): Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol* 10: 18–26.
46. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R (2011): Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients* 3: 858–876.

47. McLoughlin RF, Berthon BS, Jensen ME, Baines KJ, Wood LG (2017): Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* ajcn156265.
48. Yamaguchi M, Yang Y, Ando M, Kumrungsee T, Kato N, Okazaki Y (2018): Increased intestinal ethanol following consumption of fructooligosaccharides in rats. *Biomed Reports*.  
<https://doi.org/10.3892/br.2018.1150>
49. Engevik MA, Faletti CJ, Paulmichl M, Worrell RT (2013): Prebiotic Properties of Galursan HF 7K on Mouse Gut Microbiota. *Cell Physiol Biochem* 32: 96–110.
50. Gholizadeh Shamasbi S, Dehgan P, Mohammad-Alizadeh Charandabi S, Aliasgarzadeh A, Mirghafourvand M (2019): The effect of resistant dextrin as a prebiotic on metabolic parameters and androgen level in women with polycystic ovarian syndrome: a randomized, triple-blind, controlled, clinical trial. *Eur J Nutr* 58: 629–640.
51. Irwin C, Khalesi S, Cox AJ, Grant G, Davey AK, Bulmer AC, Desbrow B (2018): Effect of 8-weeks prebiotics/probiotics supplementation on alcohol metabolism and blood biomarkers of healthy adults: a pilot study. *Eur J Nutr* 57: 1523–1534.
52. Reynés B, Palou M, Rodríguez AM, Palou A (2019): Regulation of Adaptive Thermogenesis and Browning by Prebiotics and Postbiotics. *Front Physiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01908>
53. Mika A, Day HEW, Martinez A, Rumian NL, Greenwood BN, Chichlowski M, et al. (2017): Early life diets with prebiotics and bioactive milk fractions attenuate the impact of stress on learned helplessness behaviours and alter gene expression within neural circuits important for stress resistance. *Eur J Neurosci* 45: 342–357.
54. Dinel A-L, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N (2011): Cognitive and Emotional Alterations Are Related to Hippocampal Inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome ((M. L. Block, editor)). *PLoS One* 6: e24325.
55. Ennaceur A (2014): Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. *Physiol Behav* 135: 55–71.
56. Looijer–Van Langen MAC, Dieleman LA (2009): Prebiotics in Chronic Intestinal Inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 15: 454–462.
57. Roberfroid M (2007): Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 137: 830S-837S.
58. Rufino MN, Aleixo GFP, Trombine-Batista IE, Giuffrida R, Keller R, Bremer-Neto H (2018): Systematic review and meta-analysis of preclinical trials demonstrate robust beneficial effects of prebiotics in induced inflammatory bowel disease. *J Nutr Biochem* 62: 1–8.
59. Weber TE, Kerr BJ (2006): Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 113: 139–147.
60. Evans JM, Morris LS, Marchesi JR (2013): The gut microbiome: the role of a virtual organ in the

- endocrinology of the host. *J Endocrinol* 218: R37–R47.
61. Fülling C, Dinan TG, Cryan JF (2019): Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus.... *Neuron* 101: 998–1002.
  62. Diez-Gutiérrez L, San Vicente L, R. Barrón LJ, Villarán M del C, Chávarri M (2020): Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *J Funct Foods* 64: 103669.
  63. Sherwin E, Sandhu K V., Dinan TG, Cryan JF (2016): May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neuropsychiatry. *CNS Drugs* 30: 1019–1041.
  64. Rissman RA, Mobley WC (2011): Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer’s disease. *J Neurochem.* 25: 1669
  65. Sigel E, Steinmann ME (2012): Structure, Function, and Modulation of GABA A Receptors. *J Biol Chem* 287: 40224–40231.
  66. Romo-Araiza A, Gutiérrez-Salmeán G, Galván EJ, Hernández-Frausto M, Herrera-López G, Romo-Parra H, et al. (2018): Probiotics and Prebiotics as a Therapeutic Strategy to Improve Memory in a Model of Middle-Aged Rats. *Front Aging Neurosci* 10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00416>
  67. Chao MY, Rajagopal R, Lee FS (2006): Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical Science*. <https://doi.org/10.1042/CS20050163>
  68. Bergonzelli Degonda G, Ornstein K, Cherbut C (2006): Expresión hipocámpica de *Bifidobacterium longum* y FNDC. [no. 2 674 276]. Oficina Española de Patentes y Marcas. *SPAIN*, p 17.
  69. Gronier B, Savignac HM, Di Miceli M, Idriss SM, Tzortzis G, Anthony D, Burnet PWJ (2018): Increased cortical neuronal responses to NMDA and improved attentional set-shifting performance in rats following prebiotic (B-GOS®) ingestion. *Eur Neuropsychopharmacol* 28: 211–224.
  70. Chen X-Q, Kong F-P, Zhao Y, Du J-Z (2012): High-altitude hypoxia induces disorders of the brain-endocrine-immune network through activation of corticotropin-releasing factor and its type-1 receptors. *Chinese J Appl Physiol* 28: 481–487.
  71. Ramot A, Jiang Z, Tian J-B, Nahum T, Kuperman Y, Justice N, Chen A (2017): Hypothalamic CRFR1 is essential for HPA axis regulation following chronic stress. *Nat Neurosci* 20: 385–388.
  72. Hu Y, Li M, Lu B, Wang X, Chen C, Zhang M (2016): Corticotropin-releasing factor augments LPS-induced immune/inflammatory responses in JAWSII cells. *Immunol Res*. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8740-3>
  73. Stengel A, Taché Y (2010): Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp Biol Med* 235: 1168–1178.
  74. Kiank C, Taché Y, Larauche M (2010): Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: Role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* 24: 41–48.

75. Amarante MK, Ariza CB, Oliveira CEC de, Gualtieri K de A, Oda JMM, Watanabe MAE (2018): Inulin Induces IL-10 Secretion and Increased FOXP3 Gene Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Brazilian Arch Biol Technol* 61. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160591>
76. Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M (2011): Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 25: 397–407.

## ARTIGO 2:

### A influência dos prebióticos no eixo intestino-microbiota-cérebro e seus desfechos nos comportamentos de ansiedade

Weber Gutemberg Alves de Oliveira<sup>b</sup>; Luciano Junior Cano Freitas<sup>a</sup>; Samir Nozawa<sup>a</sup>; Heliard Rodrigues dos Santos Caetano<sup>b</sup>; Marcos Natal Rufino<sup>b</sup>, Hermann Bremer-Neto<sup>b,\*</sup>

a: Faculty of Medicine, University of West Paulista.

b: Department of Functional Sciences, University of West Paulista.

#### Resumo

A influência dos prebióticos no comportamento indicativos de ansiedade, especialmente em condições de estresse, ainda permanece controversa. Realizamos uma revisão com o objetivo de descrever os efeitos dos prebióticos em parâmetros indicadores de ansiedade em murinos, como modelo animal. Ansiedade é um transtorno mental prejudicial ao funcionamento psíquico (mental) e somático (corporal) em humanos e que demandam novas terapêuticas para o seu tratamento. Ansiedade e estresse podem remodelar a composição da microbiota intestinal por meio de hormônios do estresse, inflamação e alterações autonômicas, assim como promover o consumo de alimentos altamente palatáveis, influenciando quais bactérias intestinais prosperam. Por sua vez, bactérias intestinais podem liberar metabólitos, toxinas e neuro-hormônios que alteram o comportamento alimentar e o humor. As variações na composição da microbiota têm sido associadas a distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo ansiedade, transtornos depressivos e autismo. Em modelos animais e clínicos, estudos demonstraram que a microbiota patológica pode modular a comunicação entre o intestino e o cérebro, que inclui principalmente o sistema nervoso, o sistema imunológico e o sistema endócrino, acarretando uma série de mudanças malélicas comportamentais e físicas. A suplementação de alimentos funcionais, demonstrou modificar benéficamente a composição da microbiota intestinal, pois a microbiota que recebe prebióticos fornece aos microrganismos benéficos vantagem competitiva sobre outras bactérias do ecossistema, além disso, a microbiota que recebe prebióticos fermentam esse alimento funcional, que por sua vez fornece energia ao hospedeiro, por exemplo, na forma de ácidos graxos de cadeia curta, além de reduzir níveis de corticosterona, aumentar ácido gama amino butírico e estes produtos resultantes são liberados na circulação sanguínea, afetando o trato GI, e também outros órgãos distantes como o sistema nervoso central. Estes ácidos, hormônios e neurotransmissores podem servir como fonte de energia útil, estimular o sistema imunológico e participar como sinalizador do eixo cérebro-intestino tendo efeitos benéficos sobre parâmetros indicativos de ansiedade.

**Palavras-chave:** *Bifidobacterium* ssp.; *Lactobacillus* ssp.; Campo Aberto; Ansiolítico; Trato Gastrointestinal; Alimento funcional.

#### Abstract

This review provides information on bioactive carbohydrates, with an emphasis on their prebiotic properties, using murines as an experimental model, and their effects on parameters indicative of anxiety. Anxiety and depression are common mental disorders, with high prevalence rates and relevant social and

personal costs, which require new therapies for their treatment. Stress, anxiety and depression can reshape the composition of the intestinal microbiota through stress hormones, inflammation and autonomic changes, as well as promoting the consumption of highly palatable foods, influencing which intestinal bacteria thrive. In turn, intestinal bacteria can release metabolites, toxins and neurohormones that alter eating behavior and mood. Variations in the composition of the microbiota have been associated with neuropsychiatric disorders, including anxiety, depressive disorders and autism. In animal and clinical models, studies have shown that the pathological microbiota can modulate the communication between the intestine and the brain, which mainly includes the nervous system, the immune system and the endocrine system, causing a series of harmful behavioral and physical changes. Supplementation of functional foods has been shown to beneficially modify the composition of the intestinal microbiota, as the microbiota that receives prebiotics provides beneficial microorganisms with a competitive advantage over other bacteria in the ecosystem, in addition, the microbiota that receives prebiotics ferment this functional food, which in turn provides energy to the host, for example, in the form of short-chain fatty acids, in addition to reducing corticosterone levels, increasing gamma amino butyric acid and these resulting products are released into the bloodstream, affecting the GI tract, as well as other distant organs such as the central nervous system. These acids, hormones and neurotransmitters can serve as a source of useful energy, stimulate the immune system and participate as a signal of the brain-intestine axis, having beneficial effects on parameters indicative of anxiety.

**Keywords:** *Bifidobacterium* ssp.; *Lactobacillus* ssp.; Open field; Anxiolytic; Gastrointestinal tract; Functional food.

## 1. Introdução

Ansiedade é um transtorno mental comum, com elevadas taxas de prevalência e relevantes custos sociais e pessoais. Esse transtorno ocupa o quinto lugar dentre todas as condições de alterações de saúde mental e física, e demanda novas tecnologias e terapêuticas para o seu manejo e tratamento (Liu, Walsh, & Sheehan, 2019).

A ansiedade em murinos, como modelo experimental, é frequentemente medida usando testes comportamentais brutos (mudança na atividade locomotora, capacidade alterada de habituar-se, distúrbio de sono/vigília e função endócrina anormal) (Guarnieri, 2013; Hühne, Volkmann, Stephan, Rossner, & Landgraf, 2020; Ramos, 2008). Além disso, os níveis plasmáticos de corticosterona, além da microbiota intestinal que se modulam em resposta a alimentação e estresse, também servem como referência na investigação da ansiedade (Barrera-Bugueño et al., 2017; Burokas et al., 2017; de Cossío et al., 2017; De

Palma et al., 2015; McVey Neufeld et al., 2019; Mika et al., 2017; Skórzewska et al., 2014; Tarr et al., 2015), assim como os testes de Campo Aberto, teste do Labirinto em Cruz Elevado (De Palma et al., 2015; Skórzewska et al., 2014), teste de Enterramento de Mármore e Caixa Claro/Escuro (Burokas et al., 2017; de Cossío et al., 2017; Salviano, 2013; Tarr et al., 2015).

A microbiota intestinal é complexa, diversificada e específica do hospedeiro e pode ser influenciada por vários fatores, entre eles a dieta, idade, sexo, genética, e, de particular interesse ultimamente, o estresse e ansiedade (Goodrich et al., 2015; Gorkiewicz & Moschen, 2018; Mangiola et al., 2016; S. M. O'Mahony et al., 2009). O estresse e a ansiedade podem remodelar a composição da microbiota intestinal por meio de hormônios do estresse, inflamação e alterações autonômicas, assim como promover o consumo de alimentos altamente palatáveis, influenciando quais bactérias intestinais prosperam. Por sua vez, bactérias intestinais podem liberar metabólitos, toxinas e neuro-hormônios que alteram o comportamento alimentar e o humor, podendo impactar no cérebro, com a qual se comunica por vias neuronais e vias hormonais e/ou vias imunológicas (Clarke et al., 2013a; Liu et al., 2019; Madison & Kiecolt-Glaser, 2019) e têm sido associadas a distúrbios neuropsiquiátricos (Cryan & Dinan, 2012; Dinan & Cryan, 2017; Vuong & Hsiao, 2016).

Incluídas nas novas possibilidades terapêuticas, os prebióticos tem despertado interesse substancial nos últimos tempos, por apresentar um apelo particular, em parte, por estar potencialmente livre de efeitos colaterais cognitivos e das propriedades dependentes de vários tratamentos atualmente disponíveis para esses distúrbios (Slee et al., 2019), pois são ingredientes alimentares não digeríveis, geralmente carboidratos, que promovem o crescimento de bactérias benéficas da microbiota, estimulando seletivamente o crescimento e / ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias benéficas no cólon (Smith, Greene, Babu, & Frugé, 2019), reduzindo a capacidade de resposta ao estresse, à ansiedade e o comportamento depressivo (Cryan et al., 2019).

Esta revisão pretende mostrar os efeitos de prebióticos em estudos em murinos, ratos e camundongos, como modelo experimental, e os efeitos benéficos nos parâmetros indicativos de ansiedade.

## **2. Ansiedade**

Ansiedade é um transtorno mental comum e os custos sociais e pessoais são consideráveis, ocupando o quinto lugar em todas as condições de saúde mental e física (Liu et al., 2019). A prevalência mundial do transtorno de ansiedade é de 3,6% (World Health Organization, 2017) e essa estatística é reflexo da dinâmica da sociedade moderna, que contribui para o surgimento de transtornos mentais e comportamentais, sobretudo a ansiedade e o estresse, que se tornaram doenças muito comuns. Essas

doenças podem ser resultado da exposição a fatores de risco advindos da atividade laboral e também das relações construídas no ambiente de trabalho (Niedhammer, Malard, & Chastang, 2015).

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é uma situação comum, caracterizada por preocupação excessiva e crônica sobre diferentes temas e associada a tensão aumentada. Essas preocupações são acompanhadas de sintomas físicos relacionados à hiperatividade autonômica e a tensão muscular, assim como à taquicardia, sudorese, insônia, fadiga, dificuldade de relaxar e dores musculares (Sloan et al., 2017; Zuardi, 2017).

Em murinos esse transtorno persistente é acompanhado por distúrbios do ritmo circadiano, incluindo distúrbios do sono/vigília, mudanças na atividade locomotora e função endócrina anormal, sendo particularmente evidente mobilidade reduzida em novos ambientes, capacidade alterada de habituar-se, comportamento compensatório e comportamento inquieto consistente em muitos testes comportamentais (Arruda, Kitamura, Chaves, Silva, & Mascarim, 2011; Campos, Fogaça, Aguiar, & Guimarães, 2013).

Neurobiologicamente, o elemento central da rede de ansiedade no cérebro é a amígdala, que serve como estação de retransmissão de informações das áreas corticais e talâmicas para gerar estados comportamentais de medo e ansiedade (Hühne et al., 2020) e resultando na diminuição da sinalização inibitória pelo ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA), aumento do cortisol ou do aumento da neurotransmissão excitatória pelo glutamato, assim como implicaram a serotonina (5 hidroxitriptamina, 5-HT), noradrenalina (NE) e dopamina (DA) (Kent, Mathew, & Gorman, 2002; Martin, Ressler, Binder, & Nemeroff, 2009).

Estudos realizados em animais e voluntários sugeriram que experiências estressantes ocorrendo ao longo da vida pode contribuir crucialmente para o desenvolvimento e patogênese de vários distúrbios psiquiátricos, incluindo transtornos do humor, esquizofrenia e ansiedade. Além disso, a maioria dos sintomas de transtornos de ansiedade é acompanhada de ativação do eixo HHA e alterações nos mediadores hormonais e marcadores glicocorticoides das respostas ao estresse (Heim & Nemeroff, 2013; Mathew, Price, & Charney, 2008; Mika et al., 2018). Em testes comportamentais utilizando o labirinto em cruz elevado, o animal ao ser exposto ao braço aberto, é induzido a sinais fisiológicos de estresse verificado através do aumento da defecação e dos níveis de corticosterona (Albani et al., 2015), porém ao ser exposto a medicação ansiolítica clássica, como benzodiazepínicos, o animal demonstra redução dos sinais de ansiedade com aumento da exploração ambiental (Pellow & File, 1986).

### **3. Ansiedade e tratamentos farmacológicos, não farmacológicos ou combinado.**

Devido à sua relação risco/benefício, os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (SSRIs), sertralina, fluoxetina, citalopram, escitalopram e paroxetina, e inibidores seletivos de recaptção da serotonina e noradrenalina são recomendados como medicamentos de primeira linha e são melhor

tolerados que as demais classes, devido principalmente ao seu perfil de segurança, pois apresentam baixa toxicidade e mínimos efeitos anticolinérgicos. Porém, podem acarretar efeitos adversos como tremor, náusea, inquietação, dor de cabeça, fadiga, aumento diminuição do apetite, ganho de peso, perda de peso, tremor, sudorese, disfunção sexual, diarreia, constipação e outros efeitos colaterais (Cipriani et al., 2009; Lochmann & Richardson, 2019). Devido aos efeitos adversos, os pacientes devem ser informados que o início do efeito ansiolítico desses antidepressivos tem uma latência de 2 a 4 semanas e em alguns casos até 6 semanas (Cipriani et al., 2009; Lochmann & Richardson, 2019). Aproximadamente 30 a 40% dos pacientes que utilizam tratamento medicamentoso como antidepressivos não respondem como esperado ao tratamento, seja pela não adesão ao tratamento ou pela instabilidade da própria doença, assim como pelo aparecimento de outros transtornos subjacentes (Moraes, Bueno, Fuentes-Rojas, & Antunes, 2019).

A interrupção do tratamento com um SSRI, ou a sua retirada podem ocorrer reações, no entanto, estes são muito menos frequente e grave do que as reações de abstinência observadas após o término do tratamento com benzodiazepina, sendo que essas reações adversas podem ser mais frequentes com paroxetina do que com sertralina ou fluoxetina (Price, Cole, & Goodwin, 2009; Stahl et al., 1997).

A administração prolongada de SSRI por dois meses acarretou a liberação de 5-HT e elevação dos seus níveis, resultantes da inibição da recaptção da serotonina (5-HT). Além disso, super-ativa o auto receptor 5-HT<sub>1A</sub> do corpo celular, que tem um efeito inibitório sobre a taxa de disparo neuronal. Contudo, após a administração prolongada de SSRI, esses auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub> se tornam dessensibilizados aos níveis extracelulares elevados de 5-HT e aumentam a transmissão de 5-HT. As evidências indicam que os níveis acumulados de 5-HT têm um efeito modulador inibitório na transmissão de noradrenalina (NA), indicando a relevância clínica do tratamento com SSRI para transtornos de ansiedade (Blier & El Mansari, 2007).

A terapia não farmacológica, cognitivo-comportamental (TCC), em ansiedade pode ser considerada como a psicoterapia com o mais alto nível de evidência (Cipriani et al., 2009; Hofmann, Asnaani, Vonk, Sawyer, & Fang, 2012). Em estudos de meta-análise a eficácia da TCC nos transtornos de ansiedade foi consistentemente forte, apesar de algumas heterogeneidades na patologia, condições de comparação, dados de acompanhamento e nível de severidade. Foram relatados ainda maiores efeitos para o tratamento de compulsão obsessiva e menores para transtorno de ansiedade social, transtorno do pânico e transtorno de estresse pós-traumático (Hofmann et al., 2012).

A decisão sobre escolher psicoterapia, medicamentos ou uma combinação dos dois é do paciente, pois os medicamentos podem ter efeitos colaterais, interações e contraindicações. Além disso, custos, períodos de espera e duração do tratamento devem ser considerados. No entanto, os pacientes devem ser informados sobre as diferenças consideráveis nos tamanhos dos efeitos pré e pós dos tratamentos oferecidos e sua relação risco-benefício (Bandelow et al., 2015).

Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para reduzir o ônus dos efeitos adversos dos tratamentos farmacológicos e combinados na ansiedade. Neste sentido, os

prebióticos têm um apelo particular, em parte, por serem potencialmente livres de efeitos colaterais cognitivos e das propriedades dependentes de vários tratamentos atualmente disponíveis para esses distúrbios (Liu, 2017; Slee et al., 2019), visto que existem efeitos benéficos dos prebióticos sobre o eixo microbiota-intestino-cérebro na saúde do hospedeiro sob condições de estresse e ansiedade (Burokas et al., 2017; Cryan et al., 2019).

#### **4. Testes de comportamento, em modelo animal, como indicador de ansiedade**

A ansiedade em roedores de laboratório é frequentemente medida usando testes comportamentais brutos, com uso de labirintos, exploração de espaços e exposição a ambientes claro e escuro (Ramos, 2008). Estes cenários são utilizados nos testes comportamentais dentre eles, Campo Aberto (OF), Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Teste de Enterramento de Mármore (TEM), Caixa Claro-Escuro (CCE), com grande utilização e aceitação em experimentos pré-clínicos (Burokas et al., 2017; de Cossío et al., 2017; Salviano, 2013; Tarr et al., 2015).

A verificação de ansiedade nestes testes é realizada pela observação de aversão natural a áreas abertas com muita luz, o desejo de explorar um estímulo ameaçador percebido e redução de mobilidade. Níveis reduzidos de ansiedade levam ao aumento do comportamento exploratório. No teste de OF o aumento da ansiedade resultará em menor frequência de locomoção e preferência por permanecer perto das paredes das estruturas do teste (Ennaceur, 2014). O teste de OF desenvolvido por Hall (1936), consiste originalmente de uma arena circular bem iluminada com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, circundada por uma parede circular de 0,45 m de altura, o teste consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos de locomoção (numero de entradas no centro do OF), frequência de levantamentos, defecação e o tempo gasto na área central. Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes. Assim, além da ansiedade, o teste também é capaz de avaliar a locomoção dos animais (Guarnieri, 2013).

Já no teste LCE a tendência é que os animais permaneçam maior parte do tempo nos braços fechados. Assim, considera-se a porcentagem de preferência (tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice fidedigno de ansiedade, e quanto maior o nível de ansiedade, menor a porcentagem de permanência nos braços abertos (Garcia, Cardenas, & Morato, 2005). Murinos alimentados com inulina e submetidos aos testes de comportamento alteraram benéficamente a porcentagem de entradas no LCE (Burokas et al., 2017).

A tendência de animais de laboratório ocultar (enterrar) objetos potencialmente aversivos pode ser avaliado pelo TEM, sendo que quando administrado drogas ansiolíticas e antidepressivas esses reduzem ou suprimem esse comportamento (Garcia-Cairasco, Umeoka, & Cortes de Oliveira, 2017) Nesse teste, esferas de vidro (“bolas de gude”) são distribuídas de maneira uniforme sobre a serragem de uma caixa. O

animal é então colocado na caixa e são contabilizadas as esferas que forem enterradas no período do teste. Um maior número de esferas escondidas indica um alto nível de ansiedade (Guarnieri, 2013) e em ratos suplementados com prebiótico (FOS + GOS) houve uma tendência em reduzir o número de enterramento de mármore (Burokas et al., 2017).

A CCE é um modelo animal popular usado em farmacologia para testar respostas incondicionais de ansiedade em roedores, esses normalmente passam mais tempo no compartimento escuro do que no compartimento claro. A CCE consiste em um aparato com dois compartimentos, sendo um deles muito iluminado e o outro escuro. Uma abertura liga os compartimentos permitindo o livre acesso a ambos. O animal é colocado no centro do compartimento claro e são avaliados o tempo de permanência em cada compartimento, o número de transições e o tempo para a primeira transição do compartimento claro para o escuro. Roedores, sendo animais noturnos, preferem lugares menos iluminados, dessa forma, um aumento no tempo de permanência no compartimento claro sinaliza uma redução nos níveis de ansiedade (Guarnieri, 2013).

Ao injetar drogas ansiolíticas, a porcentagem de tempo gasto no compartimento da luz aumentará, indicando redução do comportamento de ansiedade (Salviano, 2013; Tarr et al., 2015). Camundongos expostos ao estresse e alimentados com prebióticos sialilactose 3 e 6 (3'SL e 6'SL), tiveram aumento do tempo gasto na zona clara, indicando serem benéficos nesse parâmetro de avaliação da ansiedade (Tarr et al., 2015).

## 5. Prebióticos e saúde

Os alimentos funcionais, prebióticos, são ingredientes alimentares não digeríveis, geralmente carboidratos, que promovem seletivamente o crescimento de bactérias benéficas, principalmente bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., da microbiota intestinal e modulam sua atividade (Gibson et al., 2017; Rufino et al., 2018).

Os critérios usados para classificar um composto como prebiótico são: (i) deve ser resistente ao pH ácido do estômago, não pode ser hidrolisado por enzimas de mamíferos e também não deve ser absorvido no trato GI; (ii) pode ser fermentado pela microbiota intestinal; e (iii) o crescimento e / ou atividade das bactérias intestinais podem ser seletivamente estimulados por esse composto e esse processo melhora a saúde do hospedeiro (Gibson et al., 2010).

Galactooligossacarídeos (GOS), frutooligossacarídeos (FOS) e inulina são os prebióticos mais comumente conhecidos. Os GOS não são digeríveis e são derivados da lactose que ocorre naturalmente no leite materno e consistem em cadeias de monômeros de galactose. Inulina e frutanos do tipo inulina, são conhecidas fibras alimentares solúveis (Frank, 2008). Além disso, as fibras alimentares que contêm vários polissacarídeos não amiláceos, como celulose, dextrinas, pectinas, beta-glucanas, ceras e lignina, podem

ajustar o tempo de transferência através do intestino, oferecendo os mesmos efeitos úteis que os dos frutanos do tipo inulina (Napolitano et al., 2009). Os prebióticos de ocorrência natural podem ser encontrados em vários alimentos, incluindo aspargos, chicória, tomate e trigo, e é um constituinte natural do leite materno (Al-Sheraji et al., 2013).

A inulina é um carboidrato polidisperso, constituído de subunidades de frutose (2 a 150), ligadas entre si e a uma glicose terminal, apresentando um grau médio de polimerização de 10 ou mais e a oligofrutose. A inulina e o FOS são entidades quimicamente similares, com as mesmas propriedades nutricionais. O FOS, cuja estrutura é uma cadeia linear de frutose com ligação  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) e geralmente têm unidades terminais de glicose com  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) ligação (Scott, Martin, Duncan, & Flint, 2014). As principais fontes de inulina e FOS empregadas na indústria de alimentos são a chicória (*Cichorium intybus*) e a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (Gibson, Probert, Loo, Rastall, & Roberfroid, 2004; Saad, 2006).

O prebiótico polidextrose (PDX) é uma fibra solúvel que apresenta apenas 1 kcal/g, tem baixo índice glicêmico, é obtido pela polimerização a vácuo, em presença de sorbitol, originando uma fibra funcional, com grau de polimerização de 12 (Collins, Surette, & Bercik, 2012; McVey Neufeld et al., 2019; Mika et al., 2018).

O prebiótico sialilactose é um oligossacarídeo encontrado no leite materno humano, onde o 3'SL e 6'SL são os mais abundantes, e também encontrados no leite de vaca (Csernák, Rác, Alberti, & Béni, 2020). O componente sialilado predominante no leite contém resíduos de ácido siálico, aproximadamente 73% do ácido siálico está ligado a oligossacarídeos, enquanto apenas 3% está presente em forma livre (ten Bruggencate, Bovee-Oudenhoven, Feitsma, van Hoffen, & Schoterman, 2014).

Outro prebiótico, como o mananoligossacarídeo (MOS), ainda não foi utilizado em estudos com animais e ou humanos no tratamento da ansiedade. No Brasil esse prebiótico é um resíduo agroindustrial do setor sucroalcooleiro, onde se produz aproximadamente 20 Kg de levedura seca/m<sup>3</sup> de etanol. Esse prebiótico infelizmente ainda não é bem aproveitado, sendo boa parte descartada. Portanto, sugerimos que novos estudos sejam feitos com esse prebiótico e outros ainda não testados em modelo animal e humanos.

## **6. Prebióticos Mediando Mudanças na Ansiedade**

### **6.1. Microbiota e Eixo Intestino-Cérebro**

A comunidade microbiana intestinal é diversa e específica do hospedeiro e funciona como um ecossistema complexo que contém cerca de 100 trilhões de microrganismos que atuam para estabelecer o revestimento intestinal e colabora na manutenção da homeostase local (Mangiola et al., 2016). A descoberta do tamanho e da complexidade da microbiota resultou em uma reavaliação contínua de muitos

conceitos de saúde e doença, incluindo doenças que afetam o sistema nervoso (E. A. Mayer, 2011; Vuong & Hsiao, 2016).

A existência de sinalização bidirecional entre o cérebro e a microbiota intestinal envolve múltiplos mecanismos, sendo que estressores físicos e psicológicos podem afetar a composição e a atividade metabólica da microbiota intestinal (Bienenstock, Kunze, & Forsythe, 2015), assim como alterações experimentais na microbiota podem afetar o comportamento emocional e os sistemas cerebrais relacionados (Altamirano-Barrera, Uribe, Chávez-Tapia, & Nuño-Lámbarri, 2018). Esses achados resultaram em especulações de que alterações na microbiota intestinal podem desempenhar um papel fisiopatológico nas doenças cerebrais (E. a Mayer, Knight, Mazmanian, Cryan, & Tillisch, 2014; Savignac et al., 2013; Yang, Wei, Ju, & Chen, 2019), porém somente na última década esses resultados receberam a atenção necessária (Bienenstock et al., 2015; Foster & McVey Neufeld, 2013).

Além disso, a microbiota intestinal pode impactar o cérebro com a qual se comunica por meio de neurônios hormonais e/ou vias imunológicas e seus genomas exercem considerável influência no comportamento do hospedeiro (Clarke et al., 2013b; de Cossío et al., 2017), sendo o nervo vago o principal da divisão parassimpática do SNA e demonstrou ser um caminho importante para a comunicação bidirecional entre os micróbios intestinais e o cérebro (Burokas, Moloney, Dinan, & Cryan, 2015). Essas evidências foram confirmadas em estudo utilizando camundongos e revelou que a permuta da microbiota entre animais menos ansiosos e mais ansiosos, influenciou o comportamento verificado em testes de ansiedade (Bercik et al., 2011). A alteração permanente na composição ou função da microbiota (disbiose) pode ainda alterar a sensibilidade visceral, motilidade intestinal e permeabilidade, bem como modificar maleficamente a resposta imune, promovendo um estado pró-inflamatório e alterações comportamentais (Arrieta, Stiemsma, Amenyogbe, Brown, & Finlay, 2014).

Essa complexa rede de comunicação entre a microbiota intestinal e o cérebro compreende o SNC e os sistemas simpático e parassimpático, que são ramos do sistema nervoso autônomo e do SNE, além dos sistemas neuroendócrinos, neuro-imunes e metabólitos bacterianos, como ácidos graxos de cadeia curta (SCAF) e o metabolismo da serotonina (Burokas et al., 2017; O'Mahony, Clarke, Borre, Dinan, & Cryan, 2015). O SNE regula a função intestinal, incluindo a secreção e renovação de muco, sendo que disbiose e disfunção intestinal são comumente relatadas em vários distúrbios neurológicos (Herath, Hosie, Bornstein, Franks, & Hill-Yardin, 2020).

Em ratos em estágios iniciais de vida, *germ free*, a alteração patológica da microbiota intestinal demonstrou afetar as funções essenciais gastrointestinais e do SNC, afetando o comportamento do animal. Além disso, a microbiota intestinal pode influenciar o SNC por meio da rota humoral, apresentando níveis de triptofano mais elevados no plasma, precursor da serotonina (5-HT), que é um neurotransmissor envolvido em aumento do comportamento de ansiedade (Barrera-Bugueño et al., 2017; Burokas et al., 2017).

A microbiota que recebe prebióticos, fermentam esse alimento funcional, que por sua vez fornece energia ao hospedeiro, por exemplo na forma de SCFA. Estes produtos resultantes da sua degradação são liberados na circulação sanguínea, afetando o trato GI, e também outros órgãos distantes (Davani-Davari et al., 2019; Kazemi, Noorbala, Azam, Eskandari, & Djafarian, 2019). Estes ácidos podem servir como fonte de energia útil, estimula o sistema imunológico e participa como sinalizador do eixo cérebro-intestino (Meijer, de Vos, & Priebe, 2010; Umu et al., 2013).

## 6.2. Estresse e corticosterona

As alterações dos níveis de corticosterona estão diretamente relacionadas à melhora de comportamentos de ansiedade, principalmente quando associado a situações de estresse (De Palma et al., 2015; Skórzewska et al., 2014). Quando aumentados, estes reprimem a expressão de mRNA de 5-HT1A, acarretando desordem cerebral devido a uma alteração do tecido cerebral, levando à perda de funções mentais, como a memória e a aprendizagem (Barrera-Bugueño et al., 2017; Braun & Marks, 2015; L. O'Mahony et al., 2005).

O nível de corticosterona, em murinos, demonstrou que a suplementação de prebiótico acarretou redução desse glicocorticoide, quando comparados aos grupos controle, resultante da mudança no perfil da microbiota (Barrera-Bugueño et al., 2017; Burokas et al., 2017; de Cossío et al., 2017; McVey Neufeld et al., 2019; Mika et al., 2018; Tarr et al., 2015). Esse efeito resulta do efeito benéfico da suplementação na atividade do eixo HHA e que atenua o comportamento de ansiedade (Burokas et al., 2017; Tarr et al., 2015). Porém, poucos ensaios clínicos em humanos confirmaram esta evidência e seus benefícios (Foster & McVey Neufeld, 2013).

Verificou-se também que a suplementação com prebiótico, FOS, aumentou os níveis plasmáticos da citocina anti-inflamatória IL-10 em camundongos com síndrome metabólica. Um dos principais fatores biológicos que se mostram alterados em camundongos com síndrome metabólica, capazes de atuar no cérebro modulando a reatividade metabólica e / ou comportamental. Essa modulação decorrente da suplementação do prebiótico poderia normalizar a superativação do eixo HHA e / ou distúrbios inflamatórios exibidos por camundongos com síndrome metabólica e cujo comportamento é semelhante à ansiedade (de Cossío et al., 2017).

Recentemente foi demonstrado que os prebióticos derivados do leite humano, sialilactose 3 e 6, atenuam com sucesso os sintomas semelhantes à ansiedade, pelos testes de comportamento, e induzidos por estresse em murinos (Tarr et al., 2015). Estudo utilizando os prebióticos FOS e GOS administrados juntos em camundongos submetidos ao estresse psicossocial, demonstraram atenuar os efeitos do estresse (comportamentos semelhantes à anedonia, depressão e ansiedade, conforme avaliado pelo teste de sniffing

de urina feminina, teste NF, OF e LCE, respectivamente. Além disso, os animais estressados que receberam prebióticos apresentaram níveis reduzidos de corticosterona plasmática e aumento da quantidade de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. (Burokas et al., 2017). Em murinos, a administração de FOS + GOS por três semanas diminuiu os efeitos do estresse social crônico, o aumento dos níveis de corticosterona e a produção de citocinas do baço em resposta à estimulação com concanavalina (Farzi, Fröhlich, & Holzer, 2018)

### **6.3. Produção de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (SCFA) facilitada por prebióticos**

Os SCFAs produzidos por meio da fermentação de alimentos funcionais, prebióticos, é realizada por bactérias, principalmente *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., presentes no intestino (Wong, de Souza, Kendall, Emam, & Jenkins, 2006). O crescimento dessas bactérias é, portanto, benéfico para a saúde intestinal e, ao mesmo tempo, inibe o crescimento de bactérias patogênicas (Saad, 2006).

Dessa maneira, a composição da dieta influencia diretamente a produção dos SCFA e os ácidos produzidos em maior abundância são o acetato, o propionato e o butirato (Saad, 2006), sendo rapidamente absorvidos e oxidados pelos colonócitos (células do cólon), suprimindo em aproximadamente 60% a 70% das necessidades energéticas destas células. A disponibilidade de SCFA preserva os estoques de glutamina, aminoácido considerado como principal combustível para os enterócitos (Sarkar et al., 2016).

Os resultados metabólicos da utilização do SCFA é fator crucial para a saúde do intestino e de locais distantes do TGI (Gibson et al., 2017), pois existe uma interação direta com o sistema nervoso, via ativação da resposta simpática, atravessando a barreira hemato-encefálica e influenciando a sinalização neural (Moraes et al., 2019). Impedem também efeitos deletérios no comportamento com a liberação de citocinas anti-inflamatórias e mudanças na microbiota (Burokas et al., 2017), além de reduzirem o pH do cólon e inibirem o crescimento de microrganismos não benéficos (Roberfroid, 2007), demonstrando capacidade ansiolítica (Burokas et al., 2017), diferenciação, maturação de células no hospedeiro e modulação da expressão de genes (Rufino et al., 2018; Weber & Kerr, 2006), incluindo a modulação e secreção de serotonina enteroendócrina (Evans, Morris, & Marchesi, 2013).

O aumento da produção de SCFA decorrente da utilização de oligossacarídeos pode elevar os níveis de peptídeos de saciedade circulante, capazes de penetrar na barreira hematoencefálica e iniciar cascatas neuroquímicas e de sinalização subjacentes às mudanças comportamentais observadas (Burokas et al., 2015). Também é possível que os efeitos anti-inflamatórios da administração de prebióticos, que afetam a função cerebral, sejam conferidos pelos SCFAs interagindo com células imunomoduladoras entéricas. No entanto, alterações neurobiológicas resultantes da estimulação direta de neurônios entéricos ou terminais aferentes vagais por espécies bacterianas ou metabólitos (por exemplo, neurotransmissores), ou mesmo

interações microbianas / prebióticas físicas com o lúmen intestinal, também devem ser consideradas (Burokas et al., 2015; Gibson et al., 2017).

#### **6.4. Disbiose e Psicobiótico**

A disbiose que se caracteriza como um desequilíbrio microbiano intestinal, decorrente de alterações na própria microbiota, mudando sua composição funcional suas atividades metabólicas, devido da perda de organismos benéficos, crescimento excessivo de organismos potencialmente prejudiciais e perda da diversidade microbiana geral, de maneira combinada ou isolada podem influenciar a química e o comportamento cerebral (Bercik et al., 2011; DeGruttola, Low, Mizoguchi, & Mizoguchi, 2016), sendo associado ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade (Kao, Harty, & Burnet, 2016; S. M. O'Mahony et al., 2009) e que são predominantes na sociedade atual (Sanders, Merenstein, Reid, Gibson, & Rastall, 2019).

Dietas com alimentos funcionais têm sido reconhecidas como capazes de restaurar o equilíbrio microbiano normal, e, portanto, com potencial no tratamento e ou prevenção da ansiedade (Burokas et al., 2017). Essas evidências reforçam o papel benéfico dos prebióticos e seus efeitos sobre o eixo microbiota-intestino-cérebro na saúde do hospedeiro sob condições de estresse, pois apoiam o recente alargamento da definição de psicobióticos, para incluir estratégia de tratamento baseada no uso de prebióticos (Clapp et al., 2017).

Os psicobióticos foram previamente definidos como bactérias vivas (probióticos) que, quando ingeridas, conferem benefícios à saúde mental por meio de interações com bactérias intestinais comensais. Essa definição foi expandida para abranger prebióticos e que aumentam o crescimento de bactérias intestinais benéficas (Sarkar et al., 2016). Esses psicobióticos afetam as funções e comportamentos relacionados ao SNC mediados pelo eixo intestino-cérebro por meio de vias imunológicas, humorais, neurais e metabólicas para melhorar não apenas a função GI, mas também a capacidade antidepressiva e ansiolítica (Cheng, Liu, Wu, Wang, & Tsai, 2019) e os seus efeitos benéficos foram superiores quando dois prebióticos diferentes foram combinados, o que pode ser decorrente da ampla estimulação bacteriana (Burokas et al., 2017).

#### **6.5 Serotonina e prebióticos**

A serotonina é um neurotransmissor essencial no cérebro, cujas disfunções estão implicadas em muitos distúrbios, incluindo ansiedade, depressão, agressão, hiperatividade, autismo, transtorno de déficit de

atenção, alcoolismo e esquizofrenia (Kalueff, Fox, Gallagher, & Murphy, 2007). Pesquisas recentes recomendaram que tratamento com prebióticos e probióticos podem resultar em reversão de déficits comportamentais, ajustar a composição da microbiota intestinal, aumentar os níveis periféricos do triptofano precursor da serotonina e alterar o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) e o ácido di-hidroxifenilacético (DOPAC) no cérebro de animais submetidos a estresse crônico (Desbonnet, Garrett, Clarke, Bienenstock, & Dinan, 2008)

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é uma indolamina, encontrada em células do trato GI, plaquetas e no sistema nervoso central de mamíferos e cerca de 95% da 5-HT corpórea é produzida no intestino. Adicionalmente a 5-HT apresenta-se como um importante neurotransmissor envolvido na interação entre o SNE e o SNC, importante na regulação da sensação de motilidade, secreção intestinal e também atua na ativação e condução da informação ao SNC (Gershon & Tack, 2007).

Estudos demonstram que a liberação de 5-HT a partir de células enterocromafins intestinais atua sobre os receptores 5-HT<sub>3</sub> em fibras aferentes vagais despolarizando os neurônios sensitivos dessa via, conduzindo os estímulos gerados por alterações da osmolaridade luminal e produtos da digestão de carboidrato até o SNC (hipotálamo) (Vedovato et al., 2015).

Estudo utilizando ratos com comportamento de ansiedade e suplementados com dois prebióticos associados (FOS e GOS) encontrou-se melhora desse comportamento (Burokas et al., 2017) e esta melhora pela administração de prebióticos pode ser explicada pela elevação da serotonina no córtex pré-frontal (Cryan, Markou, & Lucki, 2002).

## **6.6. Interleucina e prebióticos**

O intestino possui uma densa concentração de células imunes como segunda linha de defesa contra patógenos e o sistema imunológico representa um dos importantes mecanismos de comunicação e que sinalizam para o cérebro através do sistema circulatório e nervoso (Long-Smith et al., 2020; I. H. R. Paiva et al., 2020). Citocinas pró-inflamatórias circulantes, como IL1  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 L e IL-18, podem alcançar o SNC por transportadores saturáveis na barreira hematoencefálica, por sensibilização de neurônios aferentes vagal e por migração de células imunes circulantes (normalmente monócitos) para a vasculatura e parênquima cerebral através do plexo coróide (Miller & Raison, 2016).

A presença e a intensidade de sintomas de ansiedade foram correlacionadas com algumas citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  (Thomas et al., 2005) e que foram reduzidas com a elevação da produção de SCFA pela modificação da comunidade microbiana promovida por aumento do peso cecal e do número de bactérias de murinos que receberam os prebióticos associados, FOS + GOS (Burokas et al., 2017; de Cossío et al., 2017; Sarkar et al., 2016). O uso da suplementação prébiótica leva à redução de marcadores

pró-inflamatórios, especificamente IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR (McLoughlin, Berthon, Jensen, Baines, & Wood, 2017)

### 6.7. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e prebióticos

O BDNF é um fator de crescimento de uma família única de 50 fatores de crescimento de polipeptídeos que influenciam a proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte de células neuronais e não neuronais, além de que, faz parte da família de neurotrofinas e têm sido o foco de estudos por estar associado a vários distúrbios neurológicos (Bienenstock et al., 2015).

Estudos demonstraram que o comprometimento cognitivo associado à inflamação está relacionado à redução da expressão gênica do BDNF, e esses achados confirmam a possibilidade de interferência entre mediadores inflamatórios e neurotrofinas contribuir para o desenvolvimento de transtornos do humor (Şahin et al., 2015). Ratos germ-free mostraram importantes alterações na fisiologia cerebral, sendo estas nos níveis hipocampais do neurotransmissor serotonina, BDNF e um nível alterado de neurogênese, bem como alterações estruturais dos neurônios na amígdala e variações no nível de mielinização no córtex pré-frontal, estas alterações fornecem os meios fisiológicos para explicar as diferenças na reatividade ao estresse, relacionadas à ansiedade, comportamentos depressivos e sociais, bem como cognição observada nesses animais (Fülling, Dinan, & Cryan, 2019). Além disso, o estresse crônico pode desencadear comportamentos semelhantes à ansiedade, bem como reduzir os níveis de BDNF, assim como as citocinas podem atenuar o nível de BDNF na depressão (Guo et al., 2019).

A microbiota tem sido proposta como um elemento essencial no desenvolvimento do cérebro, pois acredita-se ativar a secreção de BDNF através da produção de butirato e a sua modulação ser feita por suplementação com prebióticos e probióticos (Romo-Araiza et al., 2018).

No hipocampo, o BDNF está associado à memória e aprendizado, mas evidências recentes indicam que seu aumento no hipocampo está associado a sintomas ansiolíticos e a comportamento antidepressivo, mostrando em ratos comportamento exploratório quando submetidos a testes comportamentais (Bercik et al., 2011). A dieta suplementada com o prebiótico PDX resultou no aumento da expressão de mRNA para o BDNF e a subunidades de ligação à glicina, subunidade GluN1, do receptor *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) no córtex pré-frontal (Mika et al., 2017; Saulnier et al., 2013; Schwab & Gänzle, 2011). O tratamento com prebióticos também diminuiu os níveis plasmáticos de corticosterona e a expressão gênica da subunidade do receptor NMDA 2A, seguida por um aumento da expressão do gene BDNF, GABA (B1) e GABA (B2) no hipocampo (Burokas et al., 2017).

Em camundongos alimentados com FOS e GOS por cinco semanas tiveram uma expressão mais alta de subunidades BDNF, NMDAR (NR1 e NR2) no hipocampo e no córtex frontal. Além disso, a

administração de GOS aumentou as concentrações circulantes do hormônio intestinal PYY, sugerindo que o PYY plasmático pode ter mediado a expressão elevada de BDNF no cérebro após a ingestão de GOS (Savignac et al., 2013).

### **6.8. Prebiótico e sua relação com a liberação de GABA**

O GABA é o principal neurotransmissor inibidor do SNC e está significativamente envolvido na regulação de muitos processos fisiológicos e psicológicos, sendo que as alterações na expressão central do receptor GABA estão implicadas na patogênese da ansiedade, que são altamente comórbidas com distúrbios funcionais do intestino (Bravo et al., 2011).

A relação entre o GABA e a ansiedade evidencia-se no fato de que todos os ansiolíticos conhecidos facilitam sua ação e seu efeito parece consistir em reduzir o funcionamento de grupos neuronais do sistema límbico, inclusive a amígdala e o hipocampo, responsáveis pela integração de reações de defesa contra ameaças de dano ou perda, ou, ainda, evocadas por situações novas (Ramot et al., 2017).

A administração de prebióticos FOS e GOS em murinos teve um efeito benéfico na expressão de vários genes no hipocampo e a associação dos prebióticos FOS + GOS aumentaram significativamente a expressão de genes BDNF e GABA, o que demonstra um favorecimento da neurogênese e inibição do sistema nervoso respectivamente (Burokas et al., 2017). Observaram também melhora na plasticidade sináptica no hipocampo (McVey Neufeld et al., 2019).

## **7. Conclusão**

Ansiedade está aumentando globalmente e tratamentos eficazes e acessíveis beneficiariam milhões de pessoas em todo o mundo. Estudos com prebióticos, principalmente em murinos, demonstraram efeitos ansiolíticos, maior diversidade de microbiota, melhora da sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro, atenuação de efeitos estressores, mudanças benéficas de neurotransmissores e marcadores que se relacionam a comportamentos ansiolíticos. Porém, são necessários outros estudos clínicos randomizados para comprovar a validade do uso de prebióticos com o objetivo atenuar ou tratar distúrbios neurocompartamentais ou mesmo no alívio dos efeitos colaterais indesejados da medicação convencional.

## **Referências**

Aizawa, E., Tsuji, H., Asahara, T., Takahashi, T., Teraishi, T., Yoshida, S., ... Kunugi, H. (2016). Possible

- association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 202, 254–257.  
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.05.038>
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>
- Albani, S. H., Andrawis, M. M., Abella, R. J. H., Fulghum, J. T., Vafamand, N., & Dumas, T. C. (2015). Behavior in the elevated plus maze is differentially affected by testing conditions in rats under and over three weeks of age. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(FEB), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00031>
- Altamirano-Barrera, A., Uribe, M., Chávez-Tapia, N. C., & Nuño-Lámbarri, N. (2018). The role of the gut microbiota in the pathology and prevention of liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 60, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.006>
- Amarante, M. K., Ariza, C. B., Oliveira, C. E. C. de, Gualtieri, K. de A., Oda, J. M. M., & Watanabe, M. A. E. (2018). Inulin Induces IL-10 Secretion and Increased FOXP3 Gene Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61.  
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160591>
- Arrieta, M., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., & Finlay, B. (2014). The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. *Frontiers in Immunology*, 5(September), 1–18.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00427>
- Arruda, E. J., Kitamura, J. H., Chaves, T. P., Silva, C. A., & Mascarim, A. L. (2011). Comportamento exploratório e ansiolítico de ratos e ratas submetidos à estimulação somatossensorial. *Revista Brasileira de Terapias e Saúde*, 2(1), 7–12. <https://doi.org/10.7436/rbts-2011.02.01.02>
- Bandelow, B., Reitt, M., Röver, C., Michaelis, S., Görlich, Y., & Wedekind, D. (2015). Efficacy of treatments for anxiety disorders. *International Clinical Psychopharmacology*, 30(4), 183–192.  
<https://doi.org/10.1097/YIC.0000000000000078>
- Barrera-Bugueño, C., Realini, O., Escobar-Luna, J., Sotomayor-Zárate, R., Gotteland, M., Julio-Pieper, M., & Bravo, J. A. (2017). Anxiogenic effects of a Lactobacillus, inulin and the synbiotic on healthy juvenile rats. *Neuroscience*, 359, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.064>
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., ... Collins, S. M. (2011). The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotropic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology*, 141(2), 599-609.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.052>
- Bienenstock, J., Kunze, W., & Forsythe, P. (2015). Microbiota and the gut–brain axis. *Nutrition Reviews*, 73(suppl 1), 28–31. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv019>
- Blier, P., & El Mansari, M. (2007). The importance of serotonin and noradrenaline in anxiety. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, 11(sup2), 16–23.

<https://doi.org/10.1080/13651500701388310>

- Braun, T. P., & Marks, D. L. (2015). The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Frontiers in Physiology*, 6(FEB), 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00012>
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., ... Cryan, J. F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Burokas, A., Arboleya, S., Moloney, R. D., Peterson, V. L., Murphy, K., Clarke, G., ... Cryan, J. F. (2017). Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. *Biological Psychiatry*, 82(7), 472–487. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.12.031>
- Burokas, A., Moloney, R. D., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Microbiota Regulation of the Mammalian Gut–Brain Axis. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 91, pp. 1–62). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.02.001>
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimarães, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2), 101–111. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., & Slavin, J. L. (2018). Health Effects and Sources of Prebiotic Dietary Fiber. *Current Developments in Nutrition*, 2(3), 1–8. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy005>
- Cheng, L.-H., Liu, Y.-W., Wu, C.-C., Wang, S., & Tsai, Y.-C. (2019). Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(3), 632–648. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.002>
- Cipriani, A., Furukawa, T. A., Salanti, G., Geddes, J. R., Higgins, J. P., Churchill, R., ... Barbui, C. (2009). Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *The Lancet*, 373(9665), 746–758. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60046-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60046-5)
- Clapp, M., Aurora, N., Herrera, L., Bhatia, M., Wilen, E., & Wakefield, S. (2017). Gut microbiota's effect on mental health: the gut-brain axis. *Clinics and Practice*. <https://doi.org/10.4081/cp.2017.987>
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R. D., Shanahan, F., ... Cryan, J. F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, 18(6), 666–673. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.77>
- Costa, C. O. da, Branco, J. C., Vieira, I. S., Souza, L. D. de M., & Silva, R. A. da. (2019). Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, 68(2), 92–100. <https://doi.org/10.1590/0047-2085000000232>

- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(10), 701–712. <https://doi.org/10.1038/nrn3346>
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, *23*(5), 238–245. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02017-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02017-5)
- Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, *99*(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Csernák, O., Rácz, B., Alberti, Á., & Béni, S. (2020). Quantitative analysis of 3’- and 6’-sialyllactose in human milk samples by HPLC-MS/MS: A validated method for the comparison of two consecutive lactation periods in the same woman. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *184*, 113184. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113184>
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S., ... Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods*, *8*(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- de Cossío, L. F., Fourrier, C., Sauvant, J., Everard, A., Capuron, L., Cani, P. D., ... Castanon, N. (2017). Impact of prebiotics on metabolic and behavioral alterations in a mouse model of metabolic syndrome. *Brain, Behavior, and Immunity*, *64*, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.022>
- De Palma, G., Blennerhassett, P., Lu, J., Deng, Y., Park, A. J., Green, W., ... Bercik, P. (2015). Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature Communications*, *6*(1), 7735. <https://doi.org/10.1038/ncomms8735>
- DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory Bowel Diseases*, *22*(5), 1137–1150. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., & Dinan, T. G. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of Psychiatric Research*, *43*(2), 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.03.009>
- Dias, B. G., Banerjee, S. B., Goodman, J. V., & Ressler, K. J. (2013). Towards new approaches to disorders of fear and anxiety. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(3), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.013>
- Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *The Journal of Physiology*, *595*(2), 489–503. <https://doi.org/10.1113/JP273106>
- Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety — Pitfalls and disappointments. *Physiology & Behavior*, *135*, 55–71. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.032>

- Evans, J. M., Morris, L. S., & Marchesi, J. R. (2013). The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *Journal of Endocrinology*, *218*(3), R37–R47. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0131>
- Farzi, A., Fröhlich, E. E., & Holzer, P. (2018). Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics*, *15*(1), 5–22. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0600-5>
- Foa, E. B., & Kozak, M. J. (2019). Treatment of Anxiety Disorders. In *Anxiety and the Anxiety Disorders* (Vol. 19, pp. 421–452). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203728215-32>
- Foster, J. A., & McVey Neufeld, K. A. (2013, May). Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.005>
- Frank, A. (2008). *Handbook of Prebiotics*. (G. R. Gibson & M. Roberfroid, Eds.), *Handbook of Prebiotics*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780849381829>
- Fülling, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2019). Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus.... *Neuron*, *101*(6), 998–1002. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.008>
- Garcia-Cairasco, N., Umeoka, E. H. L., & Cortes de Oliveira, J. A. (2017). The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: History and perspectives. *Epilepsy & Behavior*, *71*, 250–273. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.04.001>
- Garcia, A. M. B., Cardenas, F. P., & Morato, S. (2005). Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*, *85*(3), 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.04.007>
- Gershon, M. D., & Tack, J. (2007). The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. *Gastroenterology*, *132*(1), 397–414. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.002>
- Gibson, G. R., & Fuller, R. (2000). Aspects of In Vitro and In Vivo Research Approaches Directed Toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human Use. *The Journal of Nutrition*, *130*(2), 391S–395S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.391S>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, *17*(2), 259–275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., ... Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, *7*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>

- Gibson, P. R., & Shepherd, S. J. (2010). Evidence-based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The FODMAP approach. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *25*(2), 252–258. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06149.x>
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Blekhman, R., Beaumont, M., ... Ley, R. E. (2015). NIH Public Access. *Cell*, *159*(4), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053>. Human
- Gorkiewicz, G., & Moschen, A. (2018). Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv*, *472*(1), 159–172. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2277-x>
- Gronier, B., Savignac, H. M., Di Miceli, M., Idriss, S. M., Tzortzis, G., Anthony, D., & Burnet, P. W. J. (2018). Increased cortical neuronal responses to NMDA and improved attentional set-shifting performance in rats following prebiotic (B-GOS®) ingestion. *European Neuropsychopharmacology*, *28*(1), 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.11.001>
- Grover, S., Mallappa, R., Rokana, N., Duary, R., Panwar, H., & Batish, V. (2012). Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, *16*(1), 20. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.91178>
- Guarnieri, L. de O. (2013). *Estudo farmacológico, fisiológico e comportamental de ratos tratados com dose subconvulsivante de pilocarpina*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Guo, Y., Xie, J.-P., Deng, K., Li, X., Yuan, Y., Xuan, Q., ... Luo, H.-R. (2019). Prophylactic Effects of *Bifidobacterium adolescentis* on Anxiety and Depression-Like Phenotypes After Chronic Stress: A Role of the Gut Microbiota-Inflammation Axis. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*(June). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00126>
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2013). The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Depression: The Science of Mental Health*, *6*, 205–218.
- Herath, M., Hosie, S., Bornstein, J. C., Franks, A. E., & Hill-Yardin, E. L. (2020). The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*(May). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00248>
- Hofmann, S. G., Asnaani, A., Vonk, I. J. J., Sawyer, A. T., & Fang, A. (2012). The efficacy of CBT: a review of meta-analyses. *Cognitive Therapy Research*, *36*(5), 427–440. <https://doi.org/10.1007/s10608-012-9476-1>. The
- Holmes, A., Heilig, M., Rupniak, N. M. J., Steckler, T., & Griebel, G. (2003). Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, *24*(11), 580–588. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.09.011>
- Hühne, A., Volkmann, P., Stephan, M., Rossner, M., & Landgraf, D. (2020). An in-depth neurobehavioral characterization shows anxiety-like traits, impaired habituation behavior, and restlessness in male Cryptochrome -deficient mice. *Genes, Brain and Behavior*. <https://doi.org/10.1111/gbb.12661>

- Jie, Z., Bang-yao, L., Ming-jie, X., Hai-wei, L., Zu-kang, Z., Ting-song, W., & Craig, S. A. S. (2000). Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(6), 1503–1509. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.6.1503>
- Kalueff, A. V, Fox, M. A., Gallagher, P. S., & Murphy, D. L. (2007). Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes, Brain and Behavior*, 6(4), 389–400. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00270.x>
- Kao, A. C. C., Harty, S., & Burnet, P. W. J. (2016). The Influence of Prebiotics on Neurobiology and Behavior. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 131, pp. 21–48). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.08.007>
- Kazemi, A., Noorbala, A. A., Azam, K., Eskandari, M. H., & Djafarian, K. (2019). Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 38(2), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.04.010>
- Kent, J. M., Mathew, S. J., & Gorman, J. M. (2002). Molecular targets in the treatment of anxiety. *Biological Psychiatry*, 52(10), 1008–1030. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01672-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01672-4)
- Lawrence, P. J., Murayama, K., & Creswell, C. (2019). Systematic Review and Meta-Analysis: Anxiety and Depressive Disorders in Offspring of Parents With Anxiety Disorders. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 58(1), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2018.07.898>
- Liu, R. T. (2017). The microbiome as a novel paradigm in studying stress and mental health. *American Psychologist*, 72(7), 655–667. <https://doi.org/10.1037/amp0000058>
- Liu, R. T., Walsh, R. F. L., & Sheehan, A. E. (2019). Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 102(March), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.03.023>
- Lochmann, D., & Richardson, T. (2019). Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. [https://doi.org/10.1007/164\\_2018\\_172](https://doi.org/10.1007/164_2018_172)
- Long-Smith, C., O’Riordan, K. J., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020). Microbiota-Gut-Brain Axis: New Therapeutic Opportunities. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60(1), 477–502. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023628>
- Madison, A., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2019). Stress, depression, diet, and the gut microbiota: human–bacteria interactions at the core of psychoneuroimmunology and nutrition. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 28, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2019.01.011>
- Mangiola, F., Ianiro, G., Franceschi, F., Fagioli, S., Gasbarrini, G., Mangiola, F., ... Franceschi, F. (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol*, 22(1), 361–368. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.361>

- Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *18*(2), 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.008>
- Martin, E., Ressler, K., Binder, E., & Nemeroff, C. (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, GenMartin, E., Ressler, K., Binder, E., & Nemeroff, C. (2013). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatr Clin North Am.*, *32*(3), 549–575. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.05.004>.The
- Mathew, S. J., Price, R. B., & Charney, D. S. (2008). Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: Implications for novel therapeutics. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, *148*(2), 89–98. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30172>
- Mayer, E. A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(8), 453–466. <https://doi.org/10.1038/nrn3071>
- Mayer, E. a, Knight, R., Mazmanian, S. K., Cryan, J. F., & Tillisch, K. (2014). Gut Microbes and the Brain: Paradigm Shift in Neuroscience. *Journal of Neuroscience*, *34*(46), 15490–15496. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3299-14.2014>
- McLoughlin, R. F., Berthon, B. S., Jensen, M. E., Baines, K. J., & Wood, L. G. (2017). Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *ajcn156265*. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.156265>
- McVey Neufeld, K.-A., O’Mahony, S. M., Hoban, A. E., Waworuntu, R. V., Berg, B. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2019). Neurobehavioural effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG alone and in combination with prebiotics polydextrose and galactooligosaccharide in male rats exposed to early-life stress. *Nutritional Neuroscience*, *22*(6), 425–434. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1397875>
- Meijer, K., de Vos, P., & Priebe, M. G. (2010). Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *13*(6), 715–721. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833eebe5>
- Mika, A., Day, H. E. W., Martinez, A., Rumian, N. L., Greenwood, B. N., Chichlowski, M., ... Fleshner, M. (2017). Early life diets with prebiotics and bioactive milk fractions attenuate the impact of stress on learned helplessness behaviours and alter gene expression within neural circuits important for stress resistance. *European Journal of Neuroscience*, *45*(3), 342–357. <https://doi.org/10.1111/ejn.13444>
- Mika, A., Gaffney, M., Roller, R., Hills, A., Bouchet, C. A., Hulen, K. A., ... Fleshner, M. (2018). Feeding the developing brain: Juvenile rats fed diet rich in prebiotics and bioactive milk fractions exhibit reduced anxiety-related behavior and modified gene expression in emotion circuits. *Neuroscience Letters*, *677*, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.052>

- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews. Immunology*, *16*(1), 22–34.  
<https://doi.org/10.1038/nri.2015.5>
- Moraes, A. L. F. de, Bueno, R. G. A. L., Fuentes-Rojas, M., & Antunes, A. E. C. (2019). Suplementação com probióticos e depressão: estratégia terapêutica? *Revista de Ciências Médicas*, *28*(1), 31.  
<https://doi.org/10.24220/2318-0897v28n1a4455>
- Napolitano, A., Costabile, A., Martin-Pelaez, S., Vitaglione, P., Klinder, A., Gibson, G. R., & Fogliano, V. (2009). Potential prebiotic activity of oligosaccharides obtained by enzymatic conversion of durum wheat insoluble dietary fibre into soluble dietary fibre. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.07.005>
- Niedhammer, I., Malard, L., & Chastang, J. F. (2015). Occupational factors and subsequent major depressive and generalized anxiety disorders in the prospective French national SIP study Environmental and occupational health. *BMC Public Health*, *15*(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/s12889-015-1559-y>
- O'Mahony, L., Mccarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., ... Quigley, E. M. M. (2005). Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, *128*(3), 541–551. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.050>
- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, *277*, 32–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
- O'Mahony, S. M., Marchesi, J. R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A.-M., Quigley, E. M. M., ... Dinan, T. G. (2009). Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses. *Biological Psychiatry*, *65*(3), 263–267.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.026>
- Paiva, F. P., Maffili, V., & Santos, A. C. S. (2005). *Curso de Manipulação de Animais de Laboratório*. Salvador. Retrieved from [www.bioteriocentral.ufc.br](http://www.bioteriocentral.ufc.br) > arquivos > apostilha\_manipulacao
- Paiva, I. H. R., Duarte-Silva, E., & Peixoto, C. A. (2020). The role of prebiotics in cognition, anxiety, and depression. *European Neuropsychopharmacology*, *34*, 1–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.03.006>
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *24*(3), 525–529. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6)
- Price, J., Cole, V., & Goodwin, G. M. (2009). Emotional side-effects of selective serotonin reuptake inhibitors: Qualitative study. *British Journal of Psychiatry*. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.108.051110>
- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in Pharmacological*

- Sciences*, 29(10), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.07.005>
- Ramot, A., Jiang, Z., Tian, J.-B., Nahum, T., Kuperman, Y., Justice, N., & Chen, A. (2017). Hypothalamic CRFR1 is essential for HPA axis regulation following chronic stress. *Nature Neuroscience*, 20(3), 385–388. <https://doi.org/10.1038/nn.4491>
- Revest, J.-M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P.-V., & Abrous, D. N. (2009). Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Molecular Psychiatry*, 14(10), 959–967. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.15>
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2), 830S–837S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311983>
- Romo-Araiza, A., Gutiérrez-Salmeán, G., Galván, E. J., Hernández-Frausto, M., Herrera-López, G., Romo-Parra, H., ... Ibarra, A. (2018). Probiotics and Prebiotics as a Therapeutic Strategy to Improve Memory in a Model of Middle-Aged Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00416>
- Röytiö, H., & Ouwehand, A. C. (2014). The fermentation of polydextrose in the large intestine and its beneficial effects. *Beneficial Microbes*, 5(3), 305–313. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0065>
- Rufino, M. N., Aleixo, G. F. P., Trombine-Batista, I. E., Giuffrida, R., Keller, R., & Bremer-Neto, H. (2018). Systematic review and meta-analysis of preclinical trials demonstrate robust beneficial effects of prebiotics in induced inflammatory bowel disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 62, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.05.016>
- Saad, S. M. I. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(1), 1–16. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000100002>
- Şahin, T. D., Karson, A., Balçı, F., Yazır, Y., Bayramgürler, D., & Utkan, T. (2015). TNF-alpha inhibition prevents cognitive decline and maintains hippocampal BDNF levels in the unpredictable chronic mild stress rat model of depression. *Behavioural Brain Research*, 292, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.062>
- Sakai, F., Ikeuchi, Y., Urashima, T., Fujihara, M., Ohtsuki, K., & Yanahira, S. (2006). Effects of Feeding Sialyllactose and Galactosylated N-Acetylneuraminic Acid on Swimming Learning Ability and Brain Lipid Composition in Adult Rats. *Journal of Applied Glycoscience*. <https://doi.org/10.5458/jag.53.249>
- Salviano, M. F. (2013). *Análise fisiológica e comportamental de modelos animais desenvolvidos geneticamente para o estudo da ansiedade e da Doença de Alzheimer*. Universidade de Brasília.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Burnet, P. W. J. (2016). Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals. *Trends in Neurosciences*, 39(11), 763–781.

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002>

- Saulnier, D. M., Ringel, Y., Heyman, M. B., Foster, J. A., Bercik, P., Shulman, R. J., ... Guarner, F. (2013). The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes*. <https://doi.org/10.4161/gmic.22973>
- Savignac, H. M., Corona, G., Mills, H., Chen, L., Spencer, J. P. E., Tzortzis, G., & Burnet, P. W. J. (2013). Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-d-aspartate receptor subunits and d-serine. *Neurochemistry International*, 63(8), 756–764. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.006>
- Schwab, C., & Gänzle, M. (2011). Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02185.x>
- Scott, K. P., Martin, J. C., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2014). Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS Microbiology Ecology*, 87(1), 30–40. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12186>
- Shadrina, M., Bondarenko, E. A., & Slominsky, P. A. (2018). Genetics factors in major depression disease. *Frontiers in Psychiatry*, 9(JUL), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00334>
- Sistema Único de Saúde - Santa Catarina - RAPS. (2015). Protocolo da Rede de Atenção Psicossocial, baseado em evidências, para o acolhimento e o tratamento de transtornos de ansiedade generalizada. *Sistema Único de Saúde - Estado de Santa Catarina - SC*. Florianópolis: Sistema Único de Saúde.
- Skórzewska, A., Lehner, M., Wisłowska-Stanek, A., Krzańcik, P., Ziemia, A., & Płaźnik, A. (2014). The effect of chronic administration of corticosterone on anxiety- and depression-like behavior and the expression of GABA-A receptor alpha-2 subunits in brain structures of low- and high-anxiety rats. *Hormones and Behavior*, 65(1), 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.10.011>
- Slee, A., Nazareth, I., Bondaronek, P., Liu, Y., Cheng, Z., & Freemantle, N. (2019). Pharmacological treatments for generalised anxiety disorder: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet*, 393(10173), 768–777. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31793-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31793-8)
- Sloan, E., Hall, K., Moulding, R., Bryce, S., Mildred, H., & Staiger, P. K. (2017). Emotion regulation as a transdiagnostic treatment construct across anxiety, depression, substance, eating and borderline personality disorders: A systematic review. *Clinical Psychology Review*, 57, 141–163. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2017.09.002>
- Smith, K. S., Greene, M. W., Babu, J. R., & Frugé, A. D. (2019). Psychobiotics as treatment for anxiety, depression, and related symptoms: a systematic review. *Nutritional Neuroscience*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1701220>
- Stahl, M. M. S., Lindquist, M., Pettersson, M., Edwards, I. R., Sanderson, J. H., Taylor, N. F. A., ... Schou, J. S. (1997). Withdrawal reactions with selective serotonin re-uptake inhibitors as reported to

- the WHO system. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 53(3–4), 163–169.  
<https://doi.org/10.1007/s002280050357>
- Szklany, K., Wopereis, H., de Waard, C., van Wageningen, T., An, R., van Limpt, K., ... Kraneveld, A. D. (2019). Supplementation of dietary non-digestible oligosaccharides from birth onwards improve social and reduce anxiety-like behaviour in male BALB/c mice. *Nutritional Neuroscience*, 1–15.  
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1576362>
- Tarr, A. J., Galley, J. D., Fisher, S. E., Chichlowski, M., Berg, B. M., & Bailey, M. T. (2015). The prebiotics 3'Sialyllactose and 6'Sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: Evidence for effects on the gut–brain axis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 50, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.025>
- ten Bruggencate, S. J., Bovee-Oudenhoven, I. M., Feitsma, A. L., van Hoffen, E., & Schoterman, M. H. (2014). Functional role and mechanisms of sialyllactose and other sialylated milk oligosaccharides. *Nutrition Reviews*, 72(6), 377–389. <https://doi.org/10.1111/nure.12106>
- Thomas, A. J., Davis, S., Morris, C., Jackson, E., Harrison, R., & O'Brien, J. T. (2005). Increase in Interleukin-1 $\beta$  in Late-Life Depression. *American Journal of Psychiatry*, 162(1), 175–177.  
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.1.175>
- Umu, Ö. C. O., Oostindjer, M., Pope, P. B., Svihus, B., Egelanddal, B., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2013). Potential applications of gut microbiota to control human physiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(5), 609–618. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0008-0>
- Vedovato, K., Trevizan, A. R., Zucoloto, C. N., Bernardi, M. D. L., Zanoni, J. N., & Martins, J. V. C. P. (2015). O eixo intestino-cérebro e o papel da serotonina. *Arquivos de Ciências Da Saúde Da UNIPAR*, 18(1), 33–42. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v18i1.2014.5156>
- Velasquez-Manoff, M. (2015). The Peacekeepers. *Nature*, 518(7540), S3–S5.  
<https://doi.org/10.1038/518S3a>
- Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2016). Author ' s Accepted Manuscript Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum DisorderThe microbiome in ASD Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder. *Biological Psychiatry*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.024>
- Wang, B., & Brand-Miller, J. (2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601704>
- Weber, T. E., & Kerr, B. J. (2006). Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1–2), 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.04.006>
- Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A., & Jenkins, D. J. A. (2006). Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 235–243.

<https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015>

World Health Organization. (2017). Depression and other common mental disorders: global health estimates. Retrieved May 29, 2020, from

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1>

Yang, B., Wei, J., Ju, P., & Chen, J. (2019). Effects of regulating intestinal microbiota on anxiety symptoms: A systematic review. *General Psychiatry*, 32(2), e100056. <https://doi.org/10.1136/gpsych-2019-100056>

Zuardi, A. W. (2017). Basic features of generalized anxiety disorder. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, 50(supl1.), 51. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v50isupl1.p51-55>

## ANEXOS

## ANEXO A: PARECER DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) - UNOESTE

12/05/2020

Certificado

**UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica**Parecer Final**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "REVISÃO SISTEMÁTICA DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE EFEITOS DOS PREBIÓTICOS NOS INDICADORES DE ANSIEDADE", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5760 e tendo como participante(s) WEBER GUTEMBERG ALVES DE OLIVEIRA (discente), MARCOS NATAL RUFINO (discente), HELIARD RODRIGUES DOS SANTOS CAETANO (discente), SAMIR NOZAWA (discente), LUCIANO JUNIOR CANO FREITAS (discente), HERMANN BREMER NETO (orientador responsável), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 19 de Novembro de 2019.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CPDI

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18.2229-2079 - cpdi@unoeste.br  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18.2229-2079 - cep@unoeste.br  
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA - 18.2229-2079 - ceua@unoeste.br

Veja este documento em [www.unoeste.br/sgp/certificados/ver.asp?h=11cc6d5a5e4514e220b09b7324cc2f](https://www.unoeste.br/sgp/certificados/ver.asp?h=11cc6d5a5e4514e220b09b7324cc2f) informando o código de segurança 11cc6d5a5e4514e220b09b7324cc2f

<https://www.unoeste.br/sgp/certificados/ver.asp?h=11cc6d5a5e4514e220b09b7324cc2f>

1/1

## ANEXO B: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA: ARTIGO 1 – BIOLOGICAL PSYCHIATRY

# Biological Psychiatry

*A Journal of Psychiatric Neuroscience and Therapeutics*

## GUIDE FOR AUTHORS

<b>ARTICLE TYPES .....</b>	<b>3</b>
Archival Reports .....	3
Priority Communications .....	3
Reviews .....	3
Techniques and Methods .....	4
Correspondence .....	4
Commentaries and Editorials .....	4
Early Career Investigator Commentaries .....	4
Clinical Commentaries .....	5
<b>PREPARATION &amp; FORMATTING REQUIREMENTS .....</b>	<b>5</b>
Cover Letter .....	6
Manuscript .....	6
Title Page .....	6
Abstract .....	6
Main Text .....	6
Acknowledgments .....	6
Disclosures .....	7
References .....	7
Figure/Table Legends .....	7
Tables .....	7
Figures .....	8
Supplemental Information .....	8
Key Resources Table .....	9
Multimedia Content .....	9
3D Neuroimaging .....	9
Style .....	9
Psychopharmacology Nomenclature .....	10
Gene / Protein Nomenclature .....	10
<b>SUBMISSION PROCESS .....</b>	<b>10</b>
New Submission .....	11
New Submission Files .....	11
Author Notifications .....	11
Referee Suggestions .....	11
Revised Submission .....	12
Revised Submission Files .....	12
File Type Requirements .....	12
Word Limits .....	12
In This Issue Feature .....	12

*Biological Psychiatry Guide for Authors*

<b>PEER REVIEW PROCESS .....</b>	<b>13</b>
<b>EDITORIAL POLICIES.....</b>	<b>13</b>
Authorship.....	13
Corresponding Author.....	14
Disclosure of Biomedical Financial Interests and Potential Conflicts of Interest.....	14
Diversity.....	14
Ethical Considerations .....	15
Clinical Trials Registration .....	15
Research and Data Reporting Guidelines .....	15
Materials and Genes.....	16
Repository Data .....	16
Preprint Policy.....	16
<b>ACCEPTANCE AND PUBLICATION .....</b>	<b>16</b>
Proofs.....	16
Publication Schedule.....	17
Press and Embargo Policy.....	17
Fees .....	17
Cover Art.....	17
Article Sharing.....	17
NIH Public Access Policy and Other Funding Body Agreements .....	18
Copyright.....	18
<b>QUESTIONS? CONTACT US.....</b>	<b>18</b>

**GUIDE FOR AUTHORS**

*Biological Psychiatry* is the official journal of the Society of Biological Psychiatry. The *Journal* rapidly publishes reports of novel results on a broad range of topics related to the pathophysiology and treatment of major neuropsychiatric disorders. Both basic and clinical neuroscience contributions are encouraged, particularly those addressing genetic and environmental risk factors, neural circuitry and neurochemistry, and important new therapeutic approaches.

Except where explicitly stated otherwise, *Biological Psychiatry* conforms to the guidelines set forth by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (see Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (December 2018): Available from <http://www.ICMJE.org>).

All new manuscripts must be submitted through the journal website: <https://www.editorialmanager.com/bps>. All correspondence should be directed to the Editorial Office at [Biol.Psych@sobp.org](mailto:Biol.Psych@sobp.org).

**ARTICLE TYPES****Archival Reports**

Archival Reports are original research papers reporting novel results on a broad range of topics related to the pathophysiology and treatment of major neuropsychiatric disorders. Clear explication of methods and results is critical to facilitate review of papers and replicability of findings.

*Word Limit:* 4000 words in main body of text\*

*Abstract:* 250 word limit; Structure as follows: Background, Methods, Results, Conclusions

*Main Text:* Structure as follows: Introduction, Methods and Materials, Results, Discussion

*Tables/Figures:* No limit, as needed

*References:* No limit, as needed

*Supplement:* Allowed, unlimited length

**Priority Communications**

These are Archival Reports that clearly document novel experimental findings of unusual and timely significance. These papers should represent a conceptual advance in the field and are not intended for publication of preliminary results. They are expected to be acceptable for publication in essentially the form submitted. Papers that require substantial revisions or do not fit the criteria will be considered as Archival Reports. See Archival Reports for structure, word length, and other requirements.

**Reviews**

Reviews are concise and focus on current aspects of interest and research. Reviews should be novel and have sufficient supporting literature, which should be integrated into a mechanistic model when applicable. Reviews should generally not focus solely on the authors' own work. Note that meta-analyses report original data and thus, are not considered review papers; meta-analyses should be submitted as Archival Reports. Unsolicited reviews may be submitted directly. Invited reviews must first complete a pre-submission evaluation and consultation process with the Reviews Editor. The Editorial Office will provide specific details and the proposal form to all invited authors when warranted.

*Biological Psychiatry Guide for Authors*

*Word Limit:* 4000 words in main body of text\*  
*Abstract:* 250 word limit; unstructured  
*Main Text:* Structure with headings as needed  
*Tables/Figures:* Allowed to summarize or illustrate important points  
*References:* 150 maximum  
*Supplement:* Allowed, unlimited length

### Techniques and Methods

These articles feature new, improved, or noteworthy comments about techniques or methods relevant to basic or clinical research in, or treatment of, psychiatric disorders.

*Word Limit:* 3000 words in main body of text\*  
*Abstract:* 150 word limit; unstructured  
*Main Text:* Structure as follows: Introduction, Methods and Materials, Results, Discussion  
*Tables/Figures:* Maximum of two  
*References:* No limit, as needed  
*Supplement:* Allowed, unlimited length

### Correspondence

These letters to the editor are directly related to methods, procedures or interpretation of data presented in work recently published in our journal and uses new analysis of data presented, the support of previously published work, and/or scientific points to be addressed based on methodological issues. They may also present a case report that clearly and unambiguously illustrates important new principles that have not yet been demonstrated in clinical trials. When warranted, a reply from author(s) of the original work is solicited; in such cases, the editor does not issue a final decision until both articles are submitted and the pair is then published together. Correspondence is published online only as e-content.

*Word Limit:* 1000 words in main body of text\*  
*Abstract:* Not permitted  
*Main Text:* Unstructured  
*Tables/Figures:* Not encouraged, but 1-2 allowed if needed to illustrate important points  
*References:* No limit, as needed  
*Supplement:* Not permitted

### Commentaries and Editorials

These articles address points directly related to articles in the concurrent issue, and/or focus on topics of current research and interest. These are generally invited, but interested contributors may contact the Editor.

*Word Limit:* 1500 words in main body of text\*  
*Abstract:* Not permitted  
*Main Text:* Unstructured, headings are not permitted  
*Tables/Figures:* A single summarizing figure or table is encouraged  
*References:* 10 maximum  
*Supplement:* Not permitted

### Early Career Investigator Commentaries

These articles provide publishing opportunities to early career investigators (ECI), as part of a joint project between the *Journal* and the Education Committee of the Society of Biological Psychiatry. These are invited articles for which an ECI serves as the sole and corresponding author. Each ECI shall be 1) a current member of

### Biological Psychiatry Guide for Authors

the Society of Biological Psychiatry, 2) no more than 10 years out from terminal degree, and 3) not hold an academic faculty rank higher than Assistant Professor. A senior investigator mentors each ECI, acts as the content reviewer, and is recognized in the Acknowledgments section. ECI commentaries are published online only as e-content.

*Word Limit:* 1500 words in main body of text\*

*Abstract:* Not permitted

*Main Text:* Unstructured, headings are not permitted

*Tables/Figures:* A single summarizing figure or table is encouraged

*References:* 10 maximum

*Supplement:* Not permitted

### Clinical Commentaries

These invited-only commentaries are produced in collaboration with the National Neuroscience Curriculum Initiative (NNCI). Unlike regular commentaries, these articles have a specific clinical focus and are intended for a clinical audience, including medical students, residents, and clinicians. Clinical commentaries are published online only as e-content.

*Word Limit:* 1500 words in main body of text\*

*Abstract:* Not permitted

*Main Text:* Unstructured

*Tables/Figures:* A single summarizing figure or table is encouraged

*References:* 10 maximum

*Supplement:* Not permitted

\*Word limits include main text of the article only, e.g., for Archival Reports, the word count includes the Introduction, Methods and Materials, Results, and Discussion sections. When calculating word counts, exclude abstract, references, table/figure legends, acknowledgments, and disclosures.

---

## PREPARATION & FORMATTING REQUIREMENTS

The basic elements of all submissions are as follows:

- Cover letter
- Manuscript
  - › Title page
  - › Abstract
  - › Main text of article
  - › Acknowledgments
  - › Disclosures
  - › References
  - › Legends for tables and figures
- Tables
- Figures
- Supplemental Information

Further details on each element are provided below, followed by guidance on style.

## Cover Letter

Cover letters are optional for all submissions. A cover letter must be uploaded as a separate file, as it is not made available to peer reviewers.

## Manuscript

Manuscripts should contain the following sections: title page, abstract, main article text, acknowledgments, disclosures, references, footnotes, and table/figure legends. The manuscript may also include tables, in text format, at the end of the file. Begin all sections on separate pages. The manuscript file should be supplied in Word, not in PDF.

### *Title Page*

The title page should be the first page of the manuscript file and should include the following elements:

- Full article title, 200 characters or less; acronyms/abbreviations are prohibited
- Full names of all authors, in order, and their affiliations
- Corresponding author's complete mailing address, phone, and email
- Short/running title, 55 characters or less (including spaces); standard acronyms are permitted
- Six keywords

### *Abstract*

Abstracts should be structured or unstructured according to the article type and should not exceed the word limits as detailed above. Structured abstracts should have the following sections: Background, Methods, Results, Conclusions. The Methods section should explicitly state the sample size and sex/species of subjects, when applicable. For those manuscripts that require clinical trials registration (see [Clinical Trials Registration](#) section, below), the registry name, URL, and registration number should be included at the end of the abstract. References are not permitted in abstracts. Avoid the use of abbreviations/acronyms that are not used at least three times.

### *Main Text*

The text of papers should be double-spaced and structured according to the article type. It should not exceed the word limits as detailed above. Articles reporting original research (Archival Reports, Priority Communications, Techniques and Methods) should be structured with the following headings: Introduction, Methods and Materials, Results, Discussion. The introduction should provide a brief background and state the objectives/hypotheses of the current work; it should not include the findings/results of the study. The Methods and Materials section should include sufficient detail to allow other investigators to replicate the work. It is not appropriate to move the entire text of the methods to the supplement to adhere to the *Journal's* word count limits. Manufacturer name and location should be included at first mention, where applicable. Authors may reference other publications for methods that have previously been published in full detail elsewhere. Relevant ethics statements must be included; see [Ethical Considerations](#) section, below. The Results section should clearly present the experimental findings and test statistics in a logical order. The Discussion section should describe the results, interpret them in the context of prior literature, and discuss the implications and significance of the finding(s). Limitations of the current work should also be discussed.

### *Acknowledgments*

This section should include detailed information regarding all sources of funding, including grant and other material or financial support. Specify granting agency, grant number, and recipient for each funding source. The role of study sponsor(s), if any, should be stated. Identify any data that was published previously, in abstract/poster

### Biological Psychiatry Guide for Authors

form or on a preprint server. This section may also be used to acknowledge non-author contributors/collaborators and individuals who provided personal and technical assistance. If a consortium/group is listed as an author, then the individual members must be named here. Authors should secure written permission from all individuals named in this section.

#### Disclosures

This section must include the required financial disclosures and conflict of interest statements for each author. Even if every author has nothing to disclose, this must be explicitly stated. See section on [Disclosure](#), below.

#### References

References should be numbered and listed by their order of appearance in the text. Refer to references in the text with the appropriate number in parentheses. References in tables and figures should also be numbered. List all authors; if there are more than seven authors, list the first six then *et al.* Periodical abbreviations should follow those used by Index Medicus. It is not appropriate to reference papers that have not yet been published (i.e., are submitted or under review). The following are sample references for a published journal article (1), a book (2), and an edited book (3).

1. Krystal JH, Carter CS, Geschwind D, Manji HK, March JS, Nestler EJ, *et al.* (2008): It is time to take a stand for medical research and against terrorism targeting medical scientists. *Biol Psychiatry* 63: 725-727.
2. American Psychiatric Association (2013): *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing.
3. Martin JH (1985): Properties of cortical neurons, the EEG, and the mechanisms of epilepsy. In: Kandel ER, Schwartz JH, editors. *Principles of Neural Science*, 2nd ed. New York: Elsevier, pp 461-471.

The *Journal* also encourages the citation of underlying or relevant datasets in manuscripts by citing them in the text and including a data reference in the reference list. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so that it can be properly identified as a data reference. The [dataset] identifier does not appear in published articles.

#### Figure/Table Legends

Provide a brief title and legend for each figure and table. For multi-part figures, describe each panel. Avoid duplicating information in the figure/table legends that is already presented in the Methods and Materials or Results sections.

#### Tables

Tables should be cited in the text and numbered consecutively (i.e., 1, 2, 3) in the order of their mention. Each table should have a title, along with a brief description (legend). Do not duplicate information that is already presented in the text. Tables must be supplied in an editable format (Word or Excel). They may either be included at the end of the manuscript file, or uploaded individually, but not both. Table footnotes should use superscript lowercase letters, rather than symbols or bold/italic text. Colored text or shading is not permitted in tables.

## Figures

Basic figure instructions are provided here. Further details regarding electronic artwork quality and preparation can be found at <http://www.elsevier.com/artwork>.

### Key Requirements for Figures

File Formats	› TIFF, PDF, PPT, or EPS are preferred; JPEG is acceptable
Resolution	› Halftone or combination art: 300-500 dpi › Line art: 1000 dpi or supply as vector image
Image Size	› Single column width: 90 mm (255 pt) › 1.5 column width: 140 mm (397 pt) › Double column (full page) width: 190 mm (539 pt)
Font	› 8-12 point (minimum size variability) › Standard typeface (e.g., Arial, Times New Roman) › Consistent throughout
Multi-Panel Figures	› Label each panel/part with a capital letter (A, B, C,...)
Figure Titles/Legends	› Include in manuscript file, not in figure files
File Naming	› Use the figure number (Fig1.tif, Fig2.pdf, etc.)
Upload	› Supply as individual files (a single file for each figure)

Figures should be cited in the text, numbered consecutively (i.e., 1, 2, 3) in the order of their mention, and have brief legends. Each figure should be consistent in color, size, and font, and be designed proportionally so that it can later be sized as needed without loss of legibility or quality. Letters and numbers, in particular, should not vary greatly in size. RGB color mode is preferred over CMYK. High quality versions of each figure should be uploaded individually (i.e., two figures should be uploaded separately as Figure 1 and Figure 2). To reduce TIFF file size, flatten layers and then save with LZW compression before uploading. A minimum resolution of 300 dpi is required. Note that the quality of a low-resolution figure cannot be improved by artificially increasing the resolution in graphics software; figures must be initially created with sufficient quality/resolution. Figure titles and legends should be included as editable text in the manuscript file and not in the figure files.

Images should represent the original data and be minimally processed. Uniform adjustments (e.g., brightness, contrast) may be applied to an entire image, but individual elements of an image may not be adjusted, manipulated, or cropped in order to selectively highlight, obscure, delete, or otherwise misrepresent the image or its interpretation.

Color illustrations are accepted, although the cost of color printing must be paid by the author. Otherwise, all illustrations appear in color for the online version, but are reproduced in black and white in the print journal. Authors may supply black-and-white versions of color figures for printing purposes. Authors should be mindful of color choices that may be problematic when converted to grayscale. The addition of textures and different line types helps avoid such problems.

## Supplemental Information

Supplemental information, relevant to the work but not critical to support the findings, is strongly encouraged by the *Journal* and is made available via links in the online article but not published in print. All such material is peer-reviewed, but not typeset or proofed and so should be carefully prepared. Unlike other files, all supplemental information (including text, tables, and figures) should be uploaded in a single Word file whenever possible.

### *Biological Psychiatry Guide for Authors*

Exceptions are large and/or lengthy tables, which may be submitted in Excel. Word documents will automatically be converted to PDF before being posted online.

Do not number sections of text; rather, use textual headings to clearly differentiate sections. Supplementary figures and tables should appear with their titles/legends, and be numbered consecutively (i.e., Figure S1, Figure S2, Table S1). References should be included as a separate list from those in the main manuscript; number beginning with (1) and include a reference list at the end of the supplemental document. The CONSORT diagram for randomized controlled trials, when applicable, will be published in the supplement.

#### *Key Resources Table*

*Biological Psychiatry* supports efforts in the biomedical research community to improve transparency and reproducibility in published research. Thus, we are pleased to participate in the initiative to include a Key Resources Table in all published articles that report original research (Archival Reports, Priority Communications, Techniques and Methods). Authors are asked to submit this table at first revision, which should be uploaded using the "Key Resources Table" item type. This table will be published as supplemental information. The table template is available for download from the journal website or can be downloaded directly here: <https://www.biologicalpsychiatryjournal.com/content/bps-key-resources-table>.

The Key Resources Table is designed to promote reproducibility and thus, should include the resources and relevant details necessary to reproduce the study's results. It does not need to be exhaustive. We strongly encourage the use of RRID identifiers that provide persistent, unique identifiers to key study resources. Authors may search for RRIDs at <https://scicrunch.org/resources>.

#### *Multimedia Content*

Multimedia content, in formats such as AVI or MPG, is encouraged and should be uploaded as an "e-component" in the drop-down menu at the upload screen.

#### *3D Neuroimaging*

The *Journal* also encourages enrichment of online articles via support of 3D neuroimaging data visualizations. Authors may provide 3D neuroimaging data in either single (.nii) or dual (.hdr and .img) NIfTI file formats. Recommended size of a single uncompressed dataset is  $\leq 100$  MB. Multiple datasets can be submitted. Each dataset should be zipped and uploaded separately as "3D neuroimaging data" in the drop-down menu at the upload screen. Please provide a short informative description for each dataset by filling in the 'Description' field when uploading a dataset. If an article is accepted, the uploaded datasets will be available for download from the online article on ScienceDirect. For more information, see: <http://www.elsevier.com/3DNeuroimaging>.

## Style

Basic style points are as follows:

Layout	<ul style="list-style-type: none"> <li>› Double-space all text</li> <li>› Number each page</li> <li>› Line numbering is not necessary</li> </ul>
Spelling	› Use American, as opposed to British, spellings
Language	› English
Font	<ul style="list-style-type: none"> <li>› Any standard typeface is acceptable (e.g., Arial, Times New Roman)</li> <li>› Be consistent throughout (use the same typeface and size)</li> </ul>

*Biological Psychiatry Guide for Authors*

Acronyms/Abbreviations	<ul style="list-style-type: none"> <li>› Define at first use in the abstract</li> <li>› Define again at first use in the text and also in each legend</li> <li>› Avoid unnecessary/uncommon abbreviations</li> </ul>
Nomenclature	› See below

Our readership is diverse, and authors should consider that many readers are in specialty areas other than their own. It is important, therefore, to avoid jargon. Manuscripts with the broadest appeal are focused and clearly written. In highly specialized areas, the introduction should be a concise primer.

We encourage authors whose first language is not English to ask a native English speaker to review their manuscript or to use a professional language editing service prior to submission. Accepted manuscripts are copyedited to conform to the *AMA Manual of Style*.

*Psychopharmacology Nomenclature*

*Biological Psychiatry* supports the Neuroscience-based Nomenclature (NbN) project (<http://nbnomenclature.org/>), which aims to promote the use of mechanism-based nomenclature that is pharmacologically-driven, rather than indication-based. The NbN system characterizes medications based on their pharmacological domain and mode(s) of action. Authors should use NbN's glossary or official apps in order to translate between the old and new nomenclature.

*Gene / Protein Nomenclature*

Gene symbols should be italicized and differentiate by species. Human symbols should be all uppercase (*DISC1*), whereas symbols for rodents and other species should be lowercase using only an initial capital (*Disc1*). Protein products, regardless of species, are not italicized and use all uppercase letters (DISC1).

Authors should use approved nomenclature for gene symbols by consulting the appropriate public databases for correct gene names and symbols. Approved human gene symbols are available from HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) at <http://www.genenames.org/>. Approved mouse symbols are provided by The Jackson Laboratory at <http://www.informatics.jax.org/marker/>. Use symbols (e.g., *SLC6A4*, *DISC1*) as opposed to italicized full names, and avoid listing multiple names separated by a slash, such as '*Oct4/Pou5f1*'. Use one name throughout and include any alias(es) upon the first reference. Authors should submit proposed gene names that are not already approved to the appropriate nomenclature committees as soon as possible. It is the authors' responsibility to ensure these are deposited and approved before publication of an article.

---

## SUBMISSION PROCESS

All manuscripts must be submitted in electronic form through the *Biological Psychiatry* online submission and review website (<https://www.editorialmanager.com/bps>). Submission is a representation that all authors have personally reviewed and given final approval of the version submitted, and neither the manuscript nor its data have been previously published (except in abstract or preprint form) or are currently under consideration for publication elsewhere.

The *Journal* has created checklists to assist authors in the efficient submission of both new and revised manuscripts. They are entirely optional and intended solely to help authors adhere to our submission guidelines and save time so that submissions do not need to be returned for correction. The checklists are available here: <http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/content/bps-submission-checklists>.

### *Biological Psychiatry Guide for Authors*

To ensure transparency, authors are expected to clearly declare other reports/publications of their own that have used the same dataset or sample. Authors must also identify figures, tables, and/or data that have been published elsewhere. It is the author's responsibility to obtain permission from the copyright holder(s) to reproduce or modify any previously published materials.

The person designated in the system as the corresponding author must be one of the individuals named as a corresponding author on the title page. Upon finalizing the submission, the corresponding author will immediately receive an email notification that the submission has been received by the Editorial Office. If such documentation has not been received, then a problem has occurred during the submission process and should be investigated. Any manuscripts not conforming to these guidelines will be returned to the author for correction before the manuscript is processed. The manuscript status is available to the corresponding author at all times by logging into the website. The submission will receive a manuscript number once it has been processed and assigned to an editor.

#### **New Submission**

When submitting a new manuscript, authors will be asked to provide the following: valid email addresses for all authors; the names, emails and affiliations of 6 individuals who would be appropriate to review the work; and all submission files. Further details are as follows.

##### *New Submission Files*

To ease the burden of the submission process, we permit authors to upload the entire submission (minus a cover letter) as a single file, with pages numbered, in Word or PDF. Tables and figures may either be placed within the body of the manuscript or presented separately at the end. Authors must ensure that all elements are clearly legible for editors and peer reviewers. Alternatively, authors may upload individual files (cover letter, manuscript, figures, etc.) separately. All files should be labeled with appropriate and descriptive names (e.g., SmithText.doc, Fig1.eps, Table1.doc). The system will build a single PDF of the submission from the uploaded files. Regardless of how files are uploaded at this stage, all essential components of a manuscript are still required. See [Manuscript](#) section, above.

##### *Author Notifications*

The *Journal* sends a notification to every individual named as an author upon receipt of every new submission. This email provides details of the submission, including the full author list and the text of both the acknowledgments and disclosures sections. This policy requires valid email addresses for all coauthors, which must be supplied at submission; institutional email addresses are strongly preferred. When a consortium/group is named as an author, this group must be entered as an author at the relevant screen. An email address for the primary contact/principal investigator of the consortium/group should be supplied. The named individual should be someone responsible for the consortium/group and must be a member of this group.

##### *Referee Suggestions*

For all new submissions (except Commentaries and Correspondence), authors are required to provide the full names and contact information (affiliation and email) of 6 individuals who are especially qualified to referee the work and would not have a conflict of interest in reviewing the manuscript. Affiliations of the suggested referees should all be different, and none should share an affiliation with any of the authors. Editors are not appropriate to suggest as a reviewer. Authors are also permitted to identify reviewers who should be excluded from reviewing their work, but final peer reviewer selections remain at the editors' discretion.

## Revised Submission

When submitting a revised manuscript, authors are asked to provide a detailed response to reviewers, which must be uploaded as a unique Word or PDF file (separate from the cover letter). Authors may upload a 'tracked changes' version of their revision, but must always include a 'clean' non-marked version of the manuscript. For articles that report original research (Archival Reports, Priority Communications, Techniques and Methods), authors are also asked to provide a Key Resources Table (see [relevant section](#), above, for details; click [here](#) to download the template).

If revisions are a condition of publication, only two revised versions of the paper will be considered. Unsolicited revisions are not allowed.

### Revised Submission Files

All files (cover letter, response to reviewers, manuscript, figures, etc.) must be uploaded separately at revision, and should be labeled with appropriate and descriptive file names (e.g., SmithText.doc, Fig1.tif, Table1.doc). File format requirements are specified in the below table. The system will build a single PDF of the submission from the uploaded files. Authors should be careful to replace all files that have been updated since original submission and ensure all files are correctly labeled (particularly if figures and/or tables have been rearranged and subsequently renumbered).

### File Type Requirements

Cover Letter	Word or PDF
Detailed Response to Reviewers	Word or PDF
Manuscript	Word
Tables	Word or Excel
Figures	TIFF, PDF, PPT, or EPS
Supplement	Word
Key Resources Table	Excel
In This Issue Feature	Word

### Word Limits

*Biological Psychiatry* strictly enforces its word limits when a revised manuscript is submitted. Needing to address the reviewers' concerns is not a sufficient reason for exceeding the stated maximum word limits. We advise authors to critically evaluate their manuscripts to ensure that they are written as concisely and clearly as possible. Additionally, the *Journal* strongly encourages the use of Supplemental Information. This can be text, tables, and/or figures that are relevant to the work but not critical to support the findings. Supplemental Information is published online, but does not appear in print and therefore, does not count against the word limits.

### In This Issue Feature

The submission of revised manuscripts (except Commentaries and Correspondence) requires a new unique file with a brief non-technical summary of the article. The blurb should be uploaded as a text file, 50-75 words in length, and be written in laymen's terms. Should the article be accepted for publication, this summary will be used for the *In This Issue* feature when the article is published.

## PEER REVIEW PROCESS

All submissions (with the general exception of Editorials, Commentaries, and Correspondence) will be subject to blinded peer review. The actual selection of reviewers will be made by the editors. As a general rule, papers will be evaluated by three or more independent reviewers and, on occasion, an additional review for statistical adequacy may also be obtained. The comments of the reviewers are generally communicated to the authors within 30-45 days of submission.

*Biological Psychiatry* excludes reviewers who work at the same institution as any author, or those who have any other obvious conflict of interest. The identity of individual reviewers remains confidential to all parties except the Editorial Office. Reviewers are expected to treat manuscripts under peer review with the strictest confidentiality.

Authors should be aware that manuscripts may be returned without outside review when the editors deem that the paper is of insufficient general interest for the broad readership of *Biological Psychiatry*, or that the scientific priority is such that it is unlikely to receive favorable reviews. Editorial rejection is done to speed up the editorial process and to allow the authors' papers to be promptly submitted and reviewed elsewhere.

*Biological Psychiatry* is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium, an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from each other. Authors may submit a revision of their manuscript to another Consortium journal, and, at the author's request, *Biological Psychiatry* will forward the peer reviews to that journal. Authors can find a list of Consortium journals and details about forwarding reviews at <http://nprc.incf.org>.

---

## EDITORIAL POLICIES

### Authorship

To qualify for authorship, an individual must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for all or part of the content, given final approval of the submitted version, and made substantive intellectual contributions to the submitted work in the form of: 1) conception and design, and/or acquisition of data, and/or analysis of data; and 2) drafting the article, and/or revising it critically for important intellectual content. Authorship also requires agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All individuals who meet criteria for authorship must be named as authors, and all individuals named as authors must meet all authorship criteria. If authorship is attributed to a group (either solely or in addition to 1 or more individual authors), all members of the group must meet the full criteria and requirements for authorship as described above. Any changes in authorship after initial submission (additions, deletions, reordering) must be approved in writing by all authors.

The *Journal* permits shared/joint authorship in either the first or senior positions. Authors may denote on the title page which authors contributed equally and, should the article be accepted for publication, a notation will be included in the published paper.

### Corresponding Author

By electing to approve and finalize the submission of a manuscript as the corresponding author, *Biological Psychiatry* assumes the author's acknowledgment and acceptance of the following responsibilities: 1) act as the sole correspondent with the Editorial Office and the publisher, Elsevier, on all matters related to the submission, including review and correction of the typeset proof; 2) assurance that all individuals who meet the criteria for authorship are included as authors on the manuscript title page, and that the version submitted is the version that all authors have approved; and 3) assurance that written permission has been received from all individuals whose contributions to the work are included in the Acknowledgments section of the manuscript.

Although a single person must serve as the corresponding author and be responsible for the manuscript from submission through acceptance, we do permit two individuals to be named as contacts in the final, published version of a paper. This may be noted on the title page of the paper and, should the article be accepted for publication, both individuals will be named in the published paper.

### Disclosure of Biomedical Financial Interests and Potential Conflicts of Interest

*Biological Psychiatry* requires all authors to provide full disclosure of any and all biomedical financial interests. Further, we require all authors for all article types to specify the nature of potential conflicts of interest, financial or otherwise. This disclosure includes direct or indirect financial or personal relationships, interests, and affiliations relevant to the subject matter of the manuscript that have occurred over the last two years, or that are expected in the foreseeable future. This disclosure includes, but is not limited to, grants or funding, employment, affiliations, patents (in preparation, filed, or granted), inventions, honoraria, consultancies, royalties, stock options/ownership, or expert testimony. This policy of full disclosure is similar to the policies of the ICMJE and other such organizations. The conflict of interest statements should be included in the Financial Disclosures section of the manuscript at the time of submission for all article types. If an author has nothing to declare, this must be explicitly stated. Authors should contact the Editorial Office with questions or concerns, but should err on the side of inclusion when in doubt. The following is a sample text:

Dr. Einstein reports having received lecture fees from EMC Laboratories, and research funding from Quantum Enterprises. Dr. Curie disclosed consulting fees from RA Inc. Dr. Newton reported his patent on "Newtonian physics". Dr. Archimedes reported no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

It is the responsibility of all authors to ensure that their conflicts of interest and financial disclosures are included in the manuscript. Manuscripts that fail to include the complete statements of all authors upon submission will be returned to the corresponding author and will delay the processing and evaluation of the manuscript.

### Diversity

The mission of *Biological Psychiatry* is to publish impactful scientific communications. To further that mission, we promote diversity in all aspects of the publication process, including authorship, reviewing, and editing. Our diversity efforts aim to increase participation among individuals of underrepresented racial, ethnic, and gender identities; from underrepresented countries or disadvantaged backgrounds; and those with disabilities. For further information, see <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.12.009>.

## Ethical Considerations

Authors should consider all ethical issues relevant to their research. In the Methods and Materials section of the manuscript, authors should identify the institutional and/or licensing committee that approved the experiment(s) and confirm that all experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Authors of reports on human studies should include detailed information on the informed consent process, including the method(s) used to assess the subject's capacity to give informed consent, and safeguards included in the study design for protection of human subjects. When relevant patient follow-up data are available, this should also be reported. When reporting experiments on animals, authors should indicate that institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

*Biological Psychiatry* takes seriously its responsibility in ensuring scientific integrity, and will pursue any allegations of misconduct, including but not limited to plagiarism, duplicate submission or publication, data fabrication or falsification, unethical treatment of research subjects, authorship disputes, falsified referee suggestions, and undisclosed conflicts of interest. The *Journal* generally follows the guidelines recommended by the Committee on Publication Ethics (<https://publicationethics.org/>), although we also reserve the right to take alternative action(s) as deemed necessary, including contacting the authors' institution(s), funding agency, or other appropriate authority for investigation. Literature corrections, via errata or retractions, are handled on a case-by-case basis.

## Clinical Trials Registration

In concordance with the ICMJE, *Biological Psychiatry* requires the prospective registration of all clinical trials as a condition of consideration for publication. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups to one or more interventions to evaluate the effects of those interventions on health-related biomedical or behavioral outcomes. Health-related interventions are those used to modify a biomedical or health-related outcome; examples include drugs, surgical procedures, devices, behavioral treatments, dietary interventions, educational programs and treatment/prevention/diagnostic strategies. Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants; examples include pharmacokinetic measures, adverse events, health-related behaviors, and changes to physiological, biological, psychological, or neurodevelopmental parameters. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Trials must have been registered at or before the onset of patient enrollment. Retrospective registration (i.e., at the time of submission) is not acceptable. For all clinical trials and secondary analyses of original clinical trials, the trial name, URL, and registration number should be included at the end of the abstract. Acceptable registries are ClinicalTrials.gov (<https://www.clinicaltrials.gov>) or any primary registries in the World Health Organization International Clinical Trials Registry Platform (<http://www.who.int/ictrp/network/primary/en/index.html>).

## Research and Data Reporting Guidelines

*Biological Psychiatry* supports initiatives aimed at improving the reporting of biomedical research. Checklists have been developed for a number of study designs, including randomized controlled trials (CONSORT), systematic reviews (PRISMA), meta-analyses of observational studies (MOOSE), diagnostic accuracy studies (STARD), and animal research (ARRIVE). The Minimum Information for Biological and Biomedical Investigations (MIBBI) portal also provides data-reporting standards, such as MIAME for microarray experiments. A comprehensive list of reporting guidelines is available from the EQUATOR Network Library (<http://www.equator-network.org>). Authors should make use of the appropriate guidelines when drafting their papers. Peer reviewers are asked to refer to these checklists when evaluating these studies.

### *Biological Psychiatry* Guide for Authors

*Biological Psychiatry* requires the inclusion of the CONSORT materials (flow diagram and checklist) at submission for all randomized controlled trials. Authors of other study designs are encouraged, but not required, to include the relevant checklists at submission. All such materials will be published as supplemental information.

#### **Materials and Genes**

Upon publication, it is expected that authors willingly distribute to qualified academic researchers any materials (such as viruses, organisms, antibodies, nucleic acids and cell lines) that were utilized in the course of the research and that are not commercially available.

GenBank/EMBL accession numbers for primary nucleotide and amino acid sequence data should be included in the manuscript at the end of the Methods and Materials section. All microarray data (proteomic, expression arrays, chromatin arrays, etc.) must be deposited in the appropriate public database and must be accessible without restriction from the date of publication. An entry name or accession number must be included in the Methods and Materials section.

#### **Repository Data**

A growing number of private and public repositories are accumulating demographic and clinical data, genetic and genetic analysis data, DNA, and other biomaterials for use in medical research. Manuscripts submitted for publication in *Biological Psychiatry* that employ repository data and/or biomaterials must be in full compliance with the rules developed by the respective repository governing the correct citation of the repository, funding agencies, and investigators who contributed to the repository. Any other stipulation by the repository governing publications using repository data and/or biomaterials must also be followed. Authors must provide sufficient information in the manuscript for the Editor and reviewers to determine that these conditions have been met and that the repository has been established and maintained according to current ethical standards. The Editors may require authors to provide additional documentation regarding the repository during the review process.

#### **Preprint Policy**

*Biological Psychiatry* permits the submission of manuscripts that have been posted on preprint servers, including bioRxiv. However, we request that authors do not update the posted article to include changes made in response to the reviewers' comments. Authors should disclose that the article has been posted on a preprint server in the Acknowledgments/Disclosures section of the paper. If the article is accepted for publication, authors must be able to transfer copyright to the Society of Biological Psychiatry, or agree to the terms of and pay the associated fee for an open-access license.

---

## **ACCEPTANCE AND PUBLICATION**

#### **Proofs**

The corresponding author will receive proofs by email generally within 3-5 weeks of acceptance, which must be corrected and returned within 48 hours of receipt. Authors are responsible for carefully reviewing and proofreading the entire article for accuracy. Once a corrected proof is published online, additional corrections cannot be made without an erratum.

### Publication Schedule

Accepted articles are published online, prior to copyediting, within one week of final acceptance. They will be immediately citable, with an assigned digital object identifier (DOI) number. Corrected proofs are published online approximately 28 business days from final acceptance. Articles generally appear in their final paginated form within 6 months of acceptance.

### Press and Embargo Policy

The *Journal* does not typically embargo articles, but can do so in instances where authors or their institutions wish to coordinate a press release. Authors should contact the Editorial Office immediately after notification of an acceptance if they would like an embargo set for their article.

### Fees

Color illustrations are accepted. Although the cost of color printing must be paid by the author, authors may choose, at no cost, for illustrations to be reproduced in black and white in the print journal and appear in color for the online version. Color illustrations are printed at a rate of \$650 (US dollars) for the first figure, and \$100 for each additional figure. Authors may supply black-and-white versions of color figures for printing purposes.

As a primarily subscription-based journal, *Biological Psychiatry* does not otherwise have publication charges. However, authors may choose to make their article open-access, for which a fee of \$3300 (US dollars) applies. Open-access articles will be made available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform. Authors of accepted articles who wish to take advantage of this option should complete and submit the online order form sent after acceptance.

### Cover Art

*Biological Psychiatry* generally selects cover art relevant to an article appearing in that issue. The *Journal* encourages the submission of scientifically and visually interesting images that do not appear in the paper, but that would be suitable for cover art, particularly those that summarize or represent the article's findings. Authors may upload images to be considered for the cover during the submission process, or email them separately to the Editorial Office. Any such images must be the property of the submitting authors. Figures that appear in the paper are automatically considered for covers.

### Article Sharing

The Society of Biological Psychiatry and Elsevier support responsible sharing. The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<https://webshop.elsevier.com>).

## NIH Public Access Policy and Other Funding Body Agreements

As a service to our authors, our publisher, Elsevier, will deposit peer-reviewed manuscripts to PubMed Central that have reported research funded by the National Institutes of Health (NIH). To initiate this process, the corresponding author must indicate that the study received NIH funding when completing the Publishing Agreement Form, which is sent to the corresponding author via email after acceptance. Elsevier has also established agreements and policies with multiple other funding bodies, including Wellcome Trust, to help authors comply with manuscript archiving requirements. Please see the full details at <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

## Copyright

Upon acceptance of an article by the *Journal*, the corresponding author will be asked to transfer copyright to the Society of Biological Psychiatry on behalf of all authors. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information under U.S. Copyright Law. Once accepted, a paper may not be published elsewhere, including electronically, in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright holder. All copies, paper or electronic, or other use of information must include an indication of the Elsevier Inc. and Society of Biological Psychiatry copyright and full citation of the journal source. All requests for other uses will be handled through Elsevier Inc.

Authors retain the following rights: 1) Patent and trademark rights and rights to any process or procedure described in the article. 2) The right to photocopy or make single electronic copies of the article for their own personal use, including for their own classroom use, or for the personal use of colleagues, provided the copies are not offered for sale and are not distributed in a systematic way outside of their employing institution (e.g. via an email list or public file server). Posting of the article on a secure network (not accessible to the public) within the author's institute is permitted. However, if a prior version of this work (normally a preprint) has been posted to an electronic public server, the author(s) agree not to update and/or replace this prior version on the server in order to make it identical in content to the final published version, and further that posting of the article as published on a public server can only be done with Elsevier's written permission. 3) The right, subsequent to publication, to use the article or any part thereof free of charge in a printed compilation of works of their own, such as collected writings or lecture notes, in a thesis, or to expand the article into book-length form for publication. Please see the Journal Publishing Agreement, sent to the corresponding author via email after acceptance, for full details.

---

## QUESTIONS? CONTACT US

For questions about the submission or review process, please contact the Editorial Office at [Biol.Psych@sobp.org](mailto:Biol.Psych@sobp.org) or by phone at (254) 522-9700.

There is also a help menu, accessible from all screens during the submission process.

---

Updated 1/1/20

## ANEXO C: NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA: ARTIGO 2 – JOURNAL OF ANXIETY DISORDERS

# JOURNAL OF ANXIETY DISORDERS



## AUTHOR

### TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0887-6185

### DESCRIPTION

*Journal of Anxiety Disorders* is an interdisciplinary journal that publishes research papers dealing with all aspects of anxiety disorders for all age groups (child, adolescent, adult and geriatric). Manuscripts that focus on disorders formerly categorized as anxiety disorders (obsessive-compulsive disorder, posttraumatic stress disorder) and the new category of illness anxiety disorder are also within the scope of the journal. Research areas of focus include: traditional, behavioral, cognitive and biological assessment; diagnosis and classification; psychosocial and psychopharmacological treatment; genetics; epidemiology; and prevention. Theoretical and review articles that contribute substantially to current knowledge in the field are appropriate for submission.

#### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

### AUDIENCE

Psychiatrists, Psychologists, Behavior Therapists

### IMPACT FACTOR

2018: 3.472 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Elsevier BIOBASE  
 PubMed/Medline  
 PsycINFO  
 BIOSIS Citation Index  
 BRS Data  
 Current Contents - Social & Behavioral Sciences Pascal  
 Francis  
 Scopus  
 Google Scholar

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**Gordon J. G. Asmundson**, University of Regina Department of Psychology, Regina, Saskatchewan, Canada

### *Associate Editors*

**Meredith E. Coles**, SUNY College of Environmental Science and Forestry Department of Forest and Natural Resources Management, Syracuse, New York, United States

**Peter McEvoy**, Curtin University, Perth, Western Australia, Australia

**Michelle G. Newman**, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, United States

**Jasper A. Smits**, The University of Texas at Austin, Austin, Texas, United States

### *Editorial Board*

**Jonathan S. Abramowitz**, University of North Carolina at Chapel Hill Counseling and Psychological Services, Chapel Hill, North Carolina, United States

**Ron Acierno**, Medical University of South Carolina Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Charleston, South Carolina, United States

**Lynne E. Alden**, The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

**Candice A. Alfano**, University of Houston, Houston, Texas, United States

**Ananda Amstadter**, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, United States

**Cherie Armour**, Ulster University, Coleraine, United Kingdom

**Courtney Beard**, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States

**J. Gayle Beck**, The University of Memphis, Memphis, Tennessee, United States

**Eni S. Becker**, Radboud University, Nijmegen, Netherlands

**Deborah J. Beidel**, University of Central Florida, Orlando, Florida, United States

**Julia D. Buckner**, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, United States

**L. Kevin Chapman**

**Jonathan S. Comer**, Florida International University, Miami, Florida, United States

**Jesse Cogle**, Florida State University, Tallahassee, Florida, United States

**Thompson E. Davis III**, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, United States

**Gretchen Diefenbach**, Anxiety Disorders Center, Hartford, Connecticut, United States

**Laura J. Dixon**, University of Mississippi Department of Psychology, University, Mississippi, United States

**Michel Dugas**, University of Quebec at Outaouais, Gatineau, Quebec, Canada

**Jon D. Elhai**, The University of Toledo, Toledo, Ohio, United States

**Matthew T. Feldner**, University of Arkansas Bookstore, Fayetteville, Arkansas, United States

**Robert F. Ferdinand**, GGZ Delfland, Delft, Netherlands

**Thomas A. Fergus**, Baylor University, Waco, Texas, United States

**Brian Fisak**, University of North Florida, Jacksonville, Florida, United States

**Christopher A. Flessner**, Kent State University, Kent, Ohio, United States

**David Forbes**, Phoenix Australia Centre for Posttraumatic Mental Health, Melbourne, Victoria, Australia

**Martin E. Franklin**, University of Pennsylvania Department of Psychiatry, Philadelphia, Pennsylvania, United States

**B. Christopher Frueh**, University of Hawai'i at Hilo, Hilo, Hawaii, United States

**Luis Joaquin Garcia-Lopez**, University of Jaen, Jaen, Spain

**Anouk Grubaugh**, Medical University of South Carolina Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Charleston, South Carolina, United States

**Heather Hadjistavropoulos**, University of Regina, Regina, Saskatchewan, Canada

**Brian Hall**, University of Macau Faculty of Health Sciences, Macau, China

**Lauren S. Hallion**, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, United States

**Richard G. Heimberg**, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania, United States

**Charmaine Higa-McMillan**, University of Hawai'i at Hilo, Hilo, Hawaii, United States **Stefan**

**G. Hofmann**, Boston University, Boston, Massachusetts, United States

**Jonathan Huppert**, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel  
**Dawn M. Johnson**, University of Akron, Akron, Ohio, United States  
**Todd B. Kashdan**, George Mason University, Fairfax, Virginia, United States  
**Christopher A. Kearney**, University of Nevada Las Vegas, Las Vegas, Nevada, United States  
**Philip C. Kendall**, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania, United States  
**Steven R. Lawyer**, Idaho State University, Pocatello, Idaho, United States  
**Carrie Masia-Warner**, New York University, New York, United States  
**Dean McKay**, Fordham University Department of Psychology, Bronx, New York, United States  
**Richard J. McNally**, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, United States  
**Jan Mohlman**, William Paterson University of New Jersey, Wayne, New Jersey, United States **Leslie**  
**A. Morland**, University of California System, San Diego, San Diego, California, United States **Peter**  
**J. Norton**, Monash University, Clayton, Victoria, Australia  
**Thomas H. Ollendick**, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States  
**Lars-Göran Ost**, Stockholm University, Stockholm, Sweden  
**Robert H. Pietrzak**, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, United States  
**Nnamdi Pole**, Smith College, Northampton, Massachusetts, United States  
**Mark B. Powers**, The University of Texas at Austin, Austin, Texas, United States  
**Adam S. Radomsky**, Concordia University, Montréal, Quebec, Canada  
**Sheila A. M. Rauch**, Emory University, Atlanta, Georgia, United States  
**Roxann Roberson-Nay**, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, United States  
**Thomas L. Rodebaugh**, Washington University in Saint Louis, Saint Louis, Missouri, United States  
**Ken Ruggiero**, Medical University of South Carolina Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Charleston, South Carolina, United States  
**Josef I. Ruzek**, VA Palo Alto Health Care System Menlo Park Division, Menlo Park, California, United States  
**Norman B. Schmidt**, Florida State University, Tallahassee, Florida, United States  
**Tyler C. Smith**, National University School of Health and Human Services, Henderson, California, United States  
**Eric A. Storch**, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, United States  
**Charles T. Taylor**, University of California San Diego Department of Psychiatry, La Jolla, California, United States  
**Steven Taylor**, The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada  
**Ellen Teng**, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, United States  
**Matthew T. Tull**, The University of Toledo, Toledo, Ohio, United States **David**  
**Valentiner**, Northern Illinois University, DeKalb, Illinois, United States  
**Enrique Varela**, Loyola University New Orleans, New Orleans, Louisiana, United States  
**Andres G. Viana**, University of Houston, Houston, Texas, United States  
**Li Wang**, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China  
**Carl F. Weems**, Iowa State University, Ames, Iowa, United States  
**Stephen P. Whiteside**, Mayo Foundation for Medical Education and Research, Rochester, Minnesota, United States  
**Janet Woodruff-Borden**, University of Louisville, Louisville, Kentucky, United States  
**Kevin D. Wu**, Northern Illinois University, DeKalb, Illinois, United States  
**Michael J. Zvolensky**, University of Houston, Houston, Texas, United States

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print  
*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)  
*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
  - Relevant declarations of interest have been made
  - Journal policies detailed in this guide have been reviewed
  - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#). Manuscripts based on original research are limited to 6000 words of main text (i.e., not including cover page, Abstract, and references) and reviews, meta-analyses, and theoretical treatises will be limited to 8000 words of main text. Tables and figures will be limited to 5 each, regardless of manuscript type. Longer manuscripts may be considered on occasion where there is a strong and compelling rationale supported by editorial pre-approval.

## BEFORE YOU BEGIN

### Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in

English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### *Preprints*

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

#### *Elsevier Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### **Additional Information**

#### **Editorial guidance**

The *Journal of Anxiety Disorders* publishes articles of relevance to the epidemiology, psychopathology, etiology, assessment, treatment, and prevention of anxiety and related disorders in both child and adult populations. The format of the articles includes randomized controlled trials, single case clinical outcome studies, theoretical expositions, epidemiological studies, investigations of early mechanisms of risk, genetic and biomarker studies, neuroimaging studies, critical literature reviews, meta-analyses, and dissemination and implementation studies. We are also interested in evaluations of novel treatment delivery strategies, including the use of information technologies. Authors are encouraged to use methodologically rigorous sampling, structured or semistructured diagnostic interviews, randomization, therapist fidelity, and inter-rater reliability procedures where appropriate. Given limited journal space, we can accept only a limited number of studies, and we prefer to publish studies of clinical or community samples. However, we recognize that studies using other samples (e.g., undergraduate analogues) can provide meaningful increments to knowledge. Therefore, while emphasizing our preference for clinical or community samples that are most appropriate for the question under study, we will consider studies using other samples in so far as we judge them to make a significant incremental contribution to the understanding of anxiety and related disorders or anxiety psychopathology more broadly.

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### **Article structure**

### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## **Essential title page information**

- The title page must be the first page of the manuscript file.

**Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author. **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 200 words in length and should be submitted on a separate page following the title page.

### *Graphical abstract*

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

## Keywords

Include a list of four to six keywords following the Abstract. Keywords should be selected from the APA list of index descriptors unless otherwise approved by the Editor.

### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

## Artwork

### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

#### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-anxiety-disorders>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

## Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

## Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

## **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).