

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**A MODULAÇÃO TERAPÊUTICA DA MICROBIOTA INTESTINAL NO
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Julia Diziró de Sant'Anna

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.

Orientador:
Prof. Dr. Christian Hoffmann

São Paulo
2024

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Christian Hoffmann, por me apresentar ao fascinante mundo da microbiota intestinal.

Aos docentes que fizeram parte da minha jornada acadêmica, por me guiarem no aprimoramento do meu pensamento crítico.

A todos os professores que incentivaram meu gosto por estudo durante os anos escolares, em especial à minha mãe, Cristiane Diziró, que dedicou seu tempo, conhecimento e paciência para me auxiliar no meu aprendizado.

Às amizades que ganhei na universidade, com quem pude dividir as dificuldades e os bons momentos.

E principalmente à minha família, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu duvidei. Obrigada por todo o apoio.

RESUMO

DE SANT'ANNA, J.D. **A modulação terapêutica da microbiota intestinal no transtorno do espectro autista.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Introdução: A comunicação entre o intestino e o cérebro é complexa e bidirecional. Modulações intestinais influenciam aspectos cognitivos, o que proporciona um novo campo de estudo para doenças neurológicas como o Transtorno do Espectro Autista (TEA). Um regulador chave do eixo intestino-cérebro é a microbiota intestinal.

Objetivo: Analisar criticamente os estudos que almejam, através da modulação da microbiota intestinal, melhorar a qualidade de vida de pessoas com TEA. **Material e**

Métodos: Foi realizada uma revisão bibliográfica no banco de dados *PubMed*, levantando artigos sobre estudos intervencionistas, com as palavras chave: ("microbiome"[All Fields] OR "microbiota"[All Fields]) AND ("autism spectrum disorder"[All Fields] OR "autistic disorder"[All Fields] OR "asperger syndrome"[All Fields] OR "pervasive developmental disorder not otherwise specified"[All Fields])

NOT ("oral microbiota"[All Fields] OR "oral microbiome"[All Fields]) AND ("adaptive clinical trial"[Publication Type] OR "clinical study"[Publication Type] OR "clinical trial"[Publication Type] OR "controlled clinical trial"[Publication Type] OR "randomized controlled trial"[Publication Type])). **Resultados:** Foram selecionados doze estudos reportando resultados de ensaios clínicos com as intervenções: probióticos, suplementos, transplante de microbiota fecal e uma molécula sintética. Sete estudos reportaram melhora significativa em sintomas comportamentais, e quatro estudos também reportaram melhora significativa em sintomas gastrointestinais. **Conclusão:**

Apesar dos resultados positivos observados, ainda há um extenso caminho a ser percorrido na determinação de uma modulação terapêutica da microbiota intestinal para o TEA. Deve-se investir em mais estudos duplo-cego, randomizados e controlados por placebo, com tratamento de longa duração e acompanhamento subsequente.

Palavras-chave: microbiota; microbioma; eixo intestino-cérebro; Transtorno do Espectro Autista (TEA)

ABSTRACT

DE SANT'ANNA, J.D. **Therapeutic modulation of the gut microbiota in autism spectrum disorder.** 2024. Pharmacy-Biochemistry Final Paper – Faculty of Pharmaceutical Sciences – University of São Paulo, São Paulo, 2024.

Introduction: The communication between the gut and the brain is complex and bidirectional. Gut modulations influence cognitive aspects, which provides a new field of study for neurological diseases such as Autism Spectrum Disorder (ASD). A key regulator of the gut-brain axis is the gut microbiota. **Objective:** To critically analyze studies that aim to improve the quality of life of people with ASD through modulation of the gut microbiota. **Material and Methods:** A literature review was conducted in the PubMed database, gathering articles on interventional studies using the keywords: ((“microbiome”[All Fields] OR “microbiota”[All Fields]) AND (“autism spectrum disorder”[All Fields] OR “autistic disorder”[All Fields] OR “asperger syndrome”[All Fields] OR “pervasive developmental disorder not otherwise specified”[All Fields]) NOT (“oral microbiota”[All Fields] OR “oral microbiome”[All Fields])) AND (“adaptive clinical trial”[Publication Type] OR “clinical study”[Publication Type] OR “clinical trial”[Publication Type] OR “controlled clinical trial”[Publication Type] OR “randomized controlled trial”[Publication Type])). **Results:** Twelve studies reporting results of clinical trials with the following interventions were selected: probiotics, supplements, fecal microbiota transplantation and a synthetic molecule. Seven studies reported significant improvement in behavioral symptoms, and four studies also reported significant improvement in gastrointestinal symptoms. **Conclusion:** Despite the positive results observed, there is still a long way to go in determining a therapeutic modulation of the gut microbiota for ASD. More double-blind, randomized, placebo-controlled studies with long-term treatment and subsequent follow-up should be invested in.

Keywords: microbiota; microbiome; gut-brain axis; Autism Spectrum Disorder (ASD)

LISTA DE ABREVIATURAS

6-GSI	<i>Six-item Gastrointestinal Severity Index</i>
ABAS-II	<i>Adaptive Behavior Assessment System - Second Edition</i>
ABC	<i>Aberrant Behavior Checklist</i>
ABC-T	<i>Autism Behavior Checklist - Taiwan version</i>
AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
APA	Associação Americana de Psiquiatria
AQ	<i>Autism Spectrum Quotient</i>
ATEC	<i>Autism treatment evaluation checklist</i>
B-GOS	Bimuno® galacto-oligossacarídeo
CARS	<i>Childhood Autism Rating Scale</i>
CBCL	<i>Child Behavior Checklist</i>
CGI	<i>Clinical Global Impression</i>
CSHQ-A	<i>Children's Sleep Habits Questionnaire abbreviated</i>
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridização <i>in situ</i> com fluoresceína
FOS	frutooligossacarídeos
GF	<i>germ-free</i>
GI	gastrointestinal
GIH	<i>CHARGE Gastrointestinal History</i>
GSI	<i>Gastrointestinal Severity Index</i>
GSRS	<i>Gastrointestinal Symptom Rating Scale</i>
ICM	intestino-cérebro-microbiota

IL	Interleucina
KO	<i>knockout</i>
OCT	ocitocina
PCB	produto de colostro bovino
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PedsQL	<i>Pediatric Quality of Life Inventory</i>
PGI-III	<i>Parent Global Impressions - III</i>
PRAS-ASD	<i>Parent-Rated Anxiety Scale for Autism Spectrum Disorder</i>
PSI	<i>Parenting Stress Index</i>
QPGS-RIII	<i>Questionnaire on Pediatric Gastrointestinal Symptoms - Rome III Version</i>
QUIN	quinurenina
RBS-R	<i>Repetitive Behavior Scale - Revised</i>
SA	Síndrome de Asperger
SNAP-IV	<i>Swanson, Nolan, and Pelham - IV - Taiwan version</i>
SRS	<i>Social Responsiveness Scale</i>
TDAH	Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade
TEA	transtorno do espectro autista
TMF	transplante de microbiota fecal
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TTM	Terapia de Transferência de Microbiota
VABS	Vineland Adaptive Behavior Scale

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. A microbiota intestinal.....	8
1.2. Metagenômica.....	9
1.3. Relação entre TEA e microbioma.....	10
1.4. Investigação da disbiose.....	11
1.5. Evidências clínicas.....	13
2. OBJETIVO.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Estratégias de pesquisa.....	15
3.2. Critérios de inclusão e de exclusão.....	16
3.4. Coleta e análise dos dados.....	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Seleção de estudos.....	17
4.2. Características dos estudos incluídos.....	17
4.3. Probiótico.....	24
4.4. Suplementos.....	32
4.5. Transplante de microbiota fecal.....	36
4.6. Molécula sintética.....	41
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) pode ser definido como um conjunto de déficits na comunicação social, além de comportamentos motores repetitivos e incomuns (LORD *et al.*, 2018). Com a revisão mais atual apontando uma estimativa global de prevalência mediana de TEA como sendo 65 a cada 10.000 pessoas (ZEIDAN *et al.*, 2022), tem-se uma parcela da população com necessidades únicas a serem atendidas pelos governos e sistemas de saúde, considerando ainda a grande heterogeneidade apresentada pelos portadores deste distúrbio de neurodesenvolvimento (LORD *et al.*, 2020).

Embora haja uma maior sensibilização do público sobre o transtorno, mudanças nos critérios de diagnóstico e melhor desempenho dos métodos de rastreio (HIROTA; KING, 2023), ainda há muitas lacunas a serem preenchidas, tais como: uma melhor relação entre os fatores de risco genéticos e ambientais já descritos e a aplicação prática de tais resultados (LORD *et al.*, 2018), seja em relação ao diagnóstico ou ao tratamento da TEA. Dessa maneira, tem-se que o diagnóstico é feito somente através de uma avaliação da apresentação comportamental (LORD *et al.*, 2020, p.9), e até o momento não foram descobertos biomarcadores específicos para o transtorno (HIROTA; KING, 2023). Já a primeira linha de tratamento são intervenções comportamentais, enquanto a farmacoterapia é utilizada apenas em casos de associação com outras doenças. Não obstante, em comparação com pessoas neurotípicas, indivíduos com TEA têm maiores taxas de depressão, ansiedade, distúrbios do sono e epilepsia (HIROTA; KING, 2023).

O estudo de metanálise conduzido por McElhanon *et al.* (2014) descreveu que crianças com TEA apresentam significativamente mais sintomas gastrointestinais (GI) do que grupos comparativos, com altas taxas de diarreia, constipação e dor abdominal. Não só distúrbios GI são prevalentes no TEA, como são frequentemente negligenciados, podendo acarretar em complicações como dificuldade de sono e distúrbios psicológicos devido ao não tratamento (MADRA; RINGEL; MARGOLIS, 2020).

Por outro lado, o estudo sobre a interação intestino-cérebro concentrou-se no funcionamento da digestão e no controle da saciedade (CRYAN *et al.*, 2019). Todavia, estudos pré-clínicos e clínicos evidenciaram a bidirecionalidade do eixo

intestino-cérebro, sua importância para a homeostase corporal e seus efeitos cognitivos e psicológicos (MAYER, 2011). Deste modo, a relação intestino-cérebro passou a ser um dos alvos no estudo de doenças psiquiátricas - como depressão e ansiedade - e neurológicas - como Parkinson e TEA (CRYAN *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas um regulador chave do eixo intestino-cérebro vem ganhando destaque: os trilhões de microrganismos que habitam o intestino (CRYAN *et al.*, 2019). A microbiota intestinal é capaz de se comunicar com o cérebro de maneira direta, por meio de moléculas de sinalização imunológicas oriundas da membrana de microrganismos ou de micróbios intactos; ou ainda por meio de metabólitos neuroativos produzidos pela microbiota a partir de moléculas provenientes da dieta ou do hospedeiro. Tal comunicação também se dá de maneira indireta, com a microbiota influenciando a modulação de moléculas neuronais, imunológicas e neuroendócrinas oriundas do intestino. (MAYER; NANCE; CHEN, 2022)

Desta forma, houve a ampliação da visão médica, ao considerar que há um sistema de interações, a tríade intestino-cérebro-microbiota (ICM) (MAYER; NANCE; CHEN, 2022), estabelecendo uma nova fronteira de pesquisa sobre a influência do microbioma no organismo humano, e qual o seu papel na fisiopatologia de doenças intestinais, psiquiátricas e neurológicas. Sendo assim, os estudos sobre o transtorno do espectro autista ganham uma nova oportunidade de avanço ao incluir o papel da microbiota em sua equação.

1.1. A microbiota intestinal

Há um microbioma distinto em quase todos os nichos do corpo humano, contudo, a microbiota intestinal se destaca dos demais locais por ser o *habitat* da maioria dos microrganismos: o cólon é o órgão com maior densidade bacteriana, uma concentração típica de 10^{11} bactérias/ml de conteúdo (SENDER; FUCHS; MILO, 2016). Esse ecossistema complexo afeta imensamente a fisiologia do corpo humano, uma vez que expande o genoma funcional, sintetizando proteínas enzimáticas não codificadas pelo hospedeiro e produzindo diversos metabólitos (KHO; LAL, 2018).

A contribuição da microbiota intestinal para seu relacionamento simbótico

com o hospedeiro é multifacetada: esses micróbios comensais aumentam a eficiência metabólica do hospedeiro, promovem resistência à colonização por patógenos, influenciam a permeabilidade da barreira intestinal e auxiliam no desenvolvimento e na regulação da resposta imunológica, mantendo um equilíbrio entre defesa e tolerância (KHO; LAL, 2018). Além, é claro, da já mencionada contribuição na comunicação entre o intestino e o cérebro.

Um aspecto importante para um microbioma saudável é a estabilidade de sua comunidade, ou seja, sua resistência a mudanças diante de estresses ecológicos e sua resiliência para retornar a um estado de equilíbrio após uma perturbação - ainda que, no caso desse ecossistema tão complexo, não idealiza-se a manutenção de populações específicas, mas sim de determinados genes e vias metabólicas (BÄCKHED *et al.*, 2012). Assim, caso esse equilíbrio seja perdido, ocorre uma disbiose, em que o funcionamento normal da microbiota é prejudicado, podendo haver a seleção de patobiontes e a produção desregulada de metabólitos derivados de micróbios prejudiciais ao hospedeiro (KHO; LAL, 2018).

1.2. Metagenômica

A metagenômica é o estudo dos genomas de comunidades microbianas inteiras, sem o cultivo em laboratório (CLARK; PAZDERNIK, 2016). No caso da microbiota intestinal, as amostras fecais são as mais utilizadas na análise, por conter uma grande diversidade dos microrganismos presentes no intestino (ALLABAND *et al.*, 2018). Em seguida, realiza-se a extração de DNA e seu sequenciamento, no intuito de estudar tanto a diversidade taxonômica quanto a funcional da microbiota (ALLABAND *et al.*, 2018). Um método comum nas pesquisas de microbioma é o sequenciamento por amplificação de regiões específicas, como o gene 16S rRNA, um componente do ribossomo de organismos procarióticos e um gene universal em bactérias e arqueias (ALLABAND *et al.*, 2018; HAO *et al.*, 2017). Uma alternativa mais recente e abrangente é o sequenciamento por shotgun, um método que fragmenta todo o genoma em pequenos pedaços de DNA, sequencia esses fragmentos e reorganiza-os de acordo com sobreposições identificadas por um software (GREEN, 2020). De toda forma, após o sequenciamento, os dados brutos são processados por meio de

ferramentas de bioinformática e os resultados são analisados estatisticamente para identificar padrões significativos e associações com condições de saúde (ALLABAND et al., 2018; HAO et al., 2017). Dentre as análises de nível superior, há duas medições muito comuns de biodiversidade microbiana, denominadas alfa e beta diversidade (Tabela 1).

Tabela 1 — Definições de diversidade alfa e beta

	Conceito	Mensuração
diversidade alfa	Medida da riqueza de espécies de uma comunidade específica	Número de espécies presentes na comunidade
diversidade beta	Medida da diferença na diversidade de duas ou mais comunidades	Número total de espécies que são únicas para cada um dos ecossistemas comparados

Definições de medidas de biodiversidade utilizadas em estudos do microbioma (PARK, 2007).

1.3. Relação entre TEA e microbioma

São muitos os fatores capazes de modular o eixo ICM, tais como a genética, o tipo de parto, a dieta e o ambiente (CRYAN et al., 2019). Dessa forma, modelos pré-clínicos desempenham o importante papel de permitir o estudo das alterações no microbioma e sua relação com o hospedeiro em condições controladas (ALAMOUDI et al., 2022). Aliás, grande parte das pesquisas que relacionam a microbiota intestinal ao comportamento social foram realizadas em modelos de roedores (NEEDHAM; TANG; WU, 2018).

Uma ferramenta bastante utilizada em estudos pré-clínicos de microbioma, é o uso de roedores “livres de germes”, denominado em inglês de *germ-free* (GF). Neste sistema é possível controlar a microbiota do hospedeiro, usando colonizações microbianas definidas, e/ou oriundas de amostras selecionadas, para estudar seus efeitos no hospedeiro (de baixo para cima) (NEEDHAM; TANG; WU, 2018). Tais estudos demonstraram que camundongos GF colonizados com a microbiota fecal de indivíduos com TEA apresentaram sintomas comportamentais enquanto que camundongos GF colonizados com a microbiota de indivíduos neurotípicos apresentam comportamento normal (SHARON et al, 2019).

Outra abordagem para estudos pré-clínicos envolve o estudo de camundongos que expressam mutações em genes já comprovadamente

associados ao transtorno, tal qual o camundongo SHANK3 *knockout* (KO), cujo fenótipo é um comportamento de limpeza repetitiva e interesse reduzido em novos camundongos (NEEDHAM; TANG; WU, 2018). A expressão da proteína SHANK3 não se restringe ao sistema nervoso central, sendo também expressa no epitélio GI (SAUER *et al*, 2019). Além disso, camundongos SHANK3 KO apresentam uma composição alterada da microbiota (SAUER *et al*, 2019) - mais uma evidência da relação autismo-microbiota.

Para além das evidências pré-clínicas, vários estudos clínicos recentes apontam para uma microbiota intestinal alterada - uma disbiose - em indivíduos autistas. No entanto, os resultados desses estudos variam e frequentemente são contraditórios, o que dificulta a definição de uma composição microbiana específica associada ao TEA. As inconsistências aparecem nos níveis de filo, gênero e espécie, assim como nas diversidades alfa e beta (HUGHES *et al.*, 2018).

1.4. Investigação da disbiose

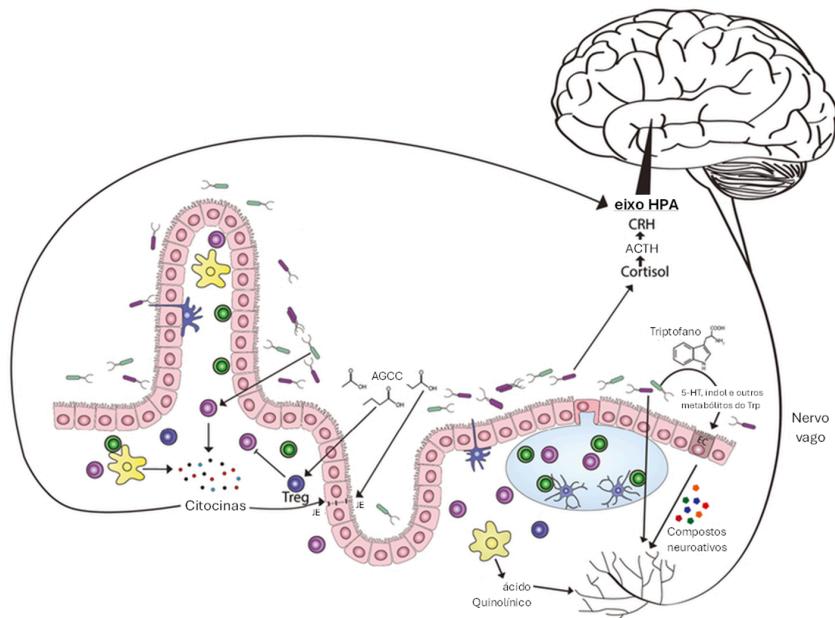
Tanto estudos clínicos quanto pré-clínicos sugerem que a disbiose observada no TEA pode estar associada a mudanças em vias metabólicas e no sistema imunológico, tanto no intestino quanto no cérebro (CHERNIKOVA *et al.*, 2021). Hughes; Rose & Ashwood (2018) e Chernikova *et al.* (2021) destacam em suas revisões as vias metabólicas do triptofano, aminoácido essencial para a síntese do neurotransmissor serotonina e portanto, capaz de afetar a função e o comportamento cerebral. O triptofano proveniente da dieta pode ser metabolizado por três vias principais: as vias metabólicas da serotonina, da quinurenina (QUIN) e do indol, sendo que o equilíbrio entre a produção de serotonina e QUIN é modulado pela microbiota intestinal, enquanto que os derivados de indóis dependem da ação da enzima triptofanase, presente em apenas determinados microorganismos (HUGHES; ROSE; ASHWOOD, 2018). Diante disso, filos, gêneros e espécies ligados à produção de indóis e seus derivados, envolvidos no metabolismo do triptofano, foram associados ao desenvolvimento de TEA e distúrbios neuropsiquiátricos relacionados. (CHERNIKOVA *et al.*, 2021)

Outro mecanismo estudado são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), produzidos na fermentação de fibras alimentares pela microbiota intestinal.

Metabólitos de AGCC geralmente são benéficos para o hospedeiro, porém alguns AGCC, como o ácido propiônico, podem ser neurotóxicos em altas concentrações, comprovadamente capazes de causar anormalidades comportamentais em modelos de roedores (HUGHES; ROSE; ASHWOOD, 2018). Ademais, os AGCC podem promover a expansão das células T reguladoras periféricas (Treg), modificando a imunidade intestinal ao promover a tolerância, bem como influenciar as proteínas da junção estreita e a função da barreira intestinal. Dessa maneira, alterações na produção de AGCC podem contribuir para uma desregulação imunológica no intestino, o que pode provocar uma inflamação periférica (HUGHES; ROSE; ASHWOOD, 2018).

Os mecanismos que compõem o eixo ICM e suas possíveis conexões com o autismo envolvem vias neuroimunes, a comunicação neural através do nervo vago — mediada pela sinalização hormonal e pela liberação de neurotransmissores por células endócrinas intestinais e células imunológicas —, além da influência de metabólitos e neurotransmissores oriundos da microbiota (HUGHES; ROSE; ASHWOOD, 2018) (Figura 1).

Figura 1 — Mecanismos do eixo Intestino-Cérebro-Microbiota



Mecanismos que levam à alteração da barreira intestinal, ativação de células imunes e liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de impactarem a comunicação com o sistema nervoso central.
 AGCC= ácidos graxos de cadeia curta; EC = células enterocromafins; Treg = célula T reguladora; JE = junções estreitas; HPA = hipotálamo-pituitária-adrenal; CRH = hormônio liberador de corticotropina; ACTH = hormônio adrenocorticotrófico; Trp = triptofano; 5-HT = serotonina.

Imagen traduzida de Hughes; Rose & Ashwood (2018).

1.5. Evidências clínicas

Diante das relações estabelecidas e das hipóteses mecanísticas sobre papel da microbiota no autismo, intervenções que visam a modulação da microbiota, tais como o uso de probióticos, prebióticos e transplante de microbiota fecal apresentam potencial para melhorar os sintomas comportamentais e comorbidades em pacientes com TEA. Atualmente, consta no banco de dados *ClinicalTrials.gov*, da *National Library of Medicine*, 49 ensaios clínicos de TEA relacionados à microbiota intestinal, sendo 73,5% dos estudos interventionistas (CLINICALTRIALS.GOV, 2024).

Nesta revisão, serão analisados criticamente artigos sobre ensaios clínicos que utilizam a microbiota como estratégia terapêutica para assegurar mais qualidade de vida aos indivíduos no espectro autista.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é construir uma revisão da literatura científica, incluindo os dados mais atuais e significativos a respeito de tratamentos para o transtorno do espectro autista envolvendo a modulação do microbioma intestinal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estratégias de pesquisa

Realizou-se uma revisão com a pergunta direcionadora “Intervir na microbiota intestinal é benéfico para crianças e adolescentes com TEA?”. Os critérios PICOS (MOHER *et al.*, 2009) foram utilizados para guiar a busca, e estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 — Critérios de elegibilidade PICOS

Parâmetro	Critério
Participantes	Crianças/adolescentes/jovens adultos com transtorno do espectro autista
Intervenção	Modulação da microbiota intestinal através do uso de probióticos, prebióticos, bioativos, transplante fecal, alteração dietética, fármacos
Comparação	Crianças/adolescentes/jovens adultos de fora do espectro ou ainda Crianças/adolescentes/jovens adultos com TEA não expostas à intervenção ou que receberam placebo
Resultados	Melhora em pelo menos um dos critérios associados ao autismo definidos pelo DSM-5: comportamentos repetitivos, dificuldade de comunicação e déficits de socialização. Diminuição de problemas gastrointestinais.
Desenho de estudo	Estudos clínicos intervencionistas

DSM-5 = Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição.

A pesquisa foi conduzida no *PubMed*, sendo os termos de pesquisa inicialmente definidos como: ("microbiome" OR "microbiota") AND ("autism spectrum disorder" OR "autistic disorder" OR "asperger syndrome" OR "pervasive developmental disorder not otherwise specified" OR "childhood disintegrative disorder") NOT ("oral microbiota" OR "oral microbiome"). Para refinar a pesquisa com apenas o tipo de estudo desejado, utilizou-se a ferramenta *Query*, isto é, filtros predefinidos fornecidos pela base de dados. Dessa maneira, os termos de busca definitivos foram: ((("microbiome"[All Fields] OR "microbiota"[All Fields]) AND ("autism spectrum disorder"[All Fields] OR "autistic disorder"[All Fields] OR "asperger syndrome"[All Fields] OR "pervasive developmental disorder not otherwise specified"[All Fields])) NOT ("oral microbiota"[All Fields] OR "oral microbiome"[All Fields])) AND ("adaptive clinical trial"[Publication Type] OR "clinical study"[Publication Type] OR "clinical trial"[Publication Type] OR "controlled clinical trial"[Publication Type])

Type] OR “randomized controlled trial”[Publication Type])).

Ressalta-se que, a partir da quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), da Associação Americana de Psiquiatria (APA), vários subgrupos de Transtorno Global de Desenvolvimento, como "transtorno autista", "transtorno de Asperger", "transtorno global do desenvolvimento não especificado de outra forma" e "transtorno desintegrativo da infância", descritos pela edição anterior, DSM-4, passaram a integrar um único diagnóstico, sob o termo guarda-chuva "transtorno do espectro autista" (LAI *et al.*, 2013). Dessa maneira, tais categorias foram consideradas como sinônimos para a pesquisa de revisão.

3.2. Critérios de inclusão e de exclusão

Os critérios de inclusão para estudos elegíveis foram: ensaios clínicos prospectivos ou retrospectivos, estudos intervencionais, com crianças, adolescentes e/ou jovens adultos de até 25 anos. Não houve restrição de período de publicação. Os critérios de exclusão foram: estudos comparativos e observacionais sem intervenção, ensaios com animais, artigos de revisão, pesquisas que não apresentaram resultados até a data de publicação, e artigos sem acesso completo disponível.

3.4. Coleta e análise dos dados

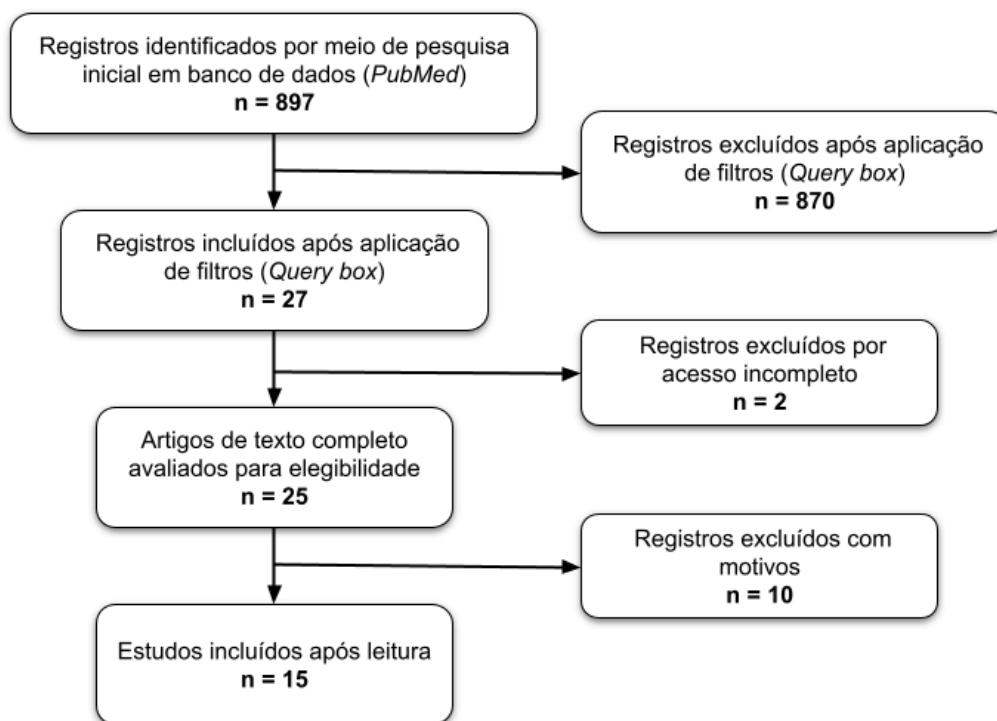
As seguintes informações foram extraídas de cada estudo: primeiro autor, ano da publicação, país, desenho do estudo, intervenção e duração do tratamento, tamanho da amostra, faixa etária dos participantes, métodos para avaliação da melhora sintomática, métodos para análise da microbiota, exames laboratoriais, intervenções, resultados.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de estudos

Através dos termos de busca iniciais, foram identificados 897 estudos no PubMed até 25 de agosto de 2024. Após a aplicação dos filtros, restaram 27 estudos elegíveis para a revisão. Dos artigos elegíveis foram excluídos 12 artigos: dois devido à indisponibilidade de acesso completo pela Universidade de São Paulo; três por não apresentarem nenhum tipo de intervenção; quatro por não possuírem resultados, sendo que um desses incluía participantes adultos com mais de 25 anos; e três por não terem foco direto na modulação da microbiota como parte da intervenção.

Figura 2 — Fluxograma para seleção de estudos



4.2. Características dos estudos incluídos

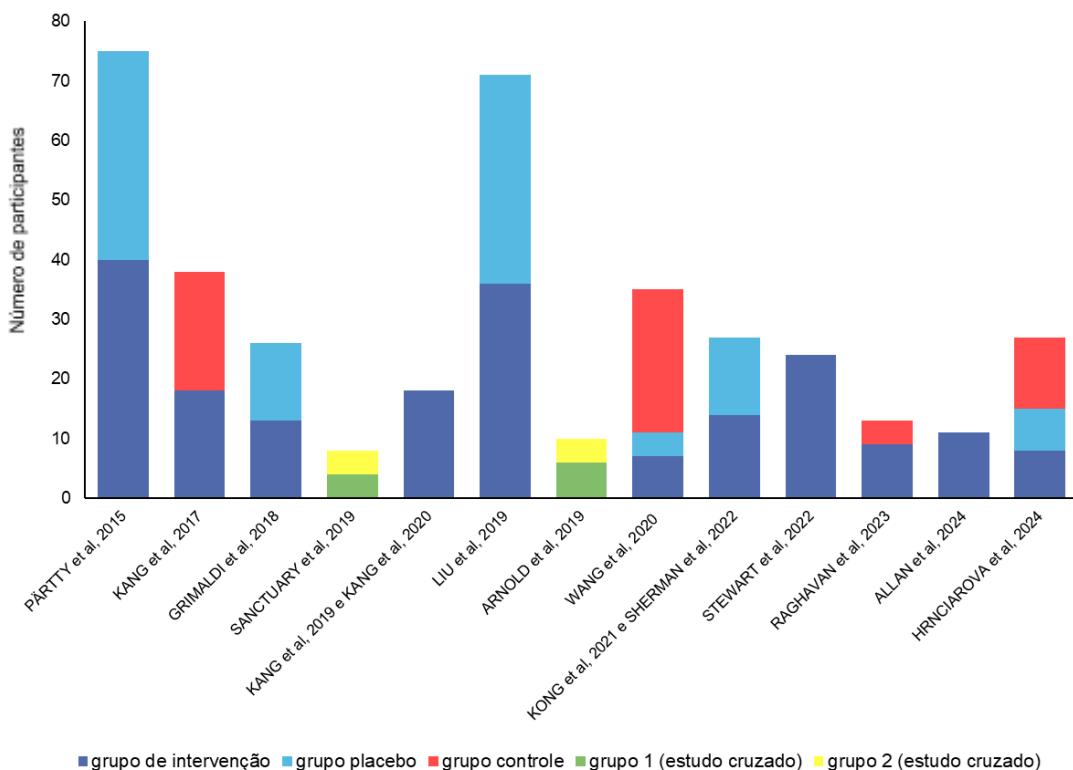
Os quinze artigos incluídos foram publicados entre 2015 e 2024, sendo que alguns estudos são continuação de outros. No caso, há três artigos sobre a pesquisa de KANG *et al.* (2017, 2019, 2020), além do estudo de SHERMAN *et al.* (2022) que sucede o de KONG *et al.* (2021). Os desenhos de estudos e intervenções podem ser

conferidos na Tabela 3, assim como o país de origem do trabalho, a duração do tratamento, número de participantes e sua faixa etária.

Acerca do tamanho amostral final de cada estudo (Figura 3), isto é, excluindo os participantes que se retiraram antes da conclusão da pesquisa, tem-se que o maior número de participantes para um grupo de intervenção foi de 40 pessoas na pesquisa de Pärty *et al.* (2015), enquanto o menor foi de sete pessoas, em duas pesquisas distintas (WANG *et al.*, 2020; ALLAN *et al.*, 2024). Na figura 4, tem-se o comparativo do tamanho amostral inicial e o final de cada ensaio clínico da revisão, com o estudo de Allan *et al.* (2024) apresentando a menor taxa de adesão.

Já na Tabela 4, apresenta-se as avaliações empregadas para analisar os desfechos sintomáticos dos participantes - levando em consideração se os questionários foram respondidos pelos pais/responsáveis dos participantes ou por profissionais clínicos -, além das análises laboratoriais utilizadas para avaliar a modulação do microbioma.

Figura 3 — Tamanho amostral final dos estudos selecionados



Os estudos agrupados numa mesma coluna utilizaram a mesma amostra. Gráfico elaborado no Excel com dados extraídos dos artigos selecionados.

Tabela 3 — Informações sobre os artigos selecionados

Estudo	País	Desenho	Intervenção	Duração do tratamento (semanas)	Número de participantes*	Faixa etária (anos)
PÄRTTY et al, 2015	Finlândia	randomizado, duplo-cego e controlado por placebo	probiótico	26,1	75	0,5–13
KANG et al, 2017	Estados Unidos	aberto, com grupo controle	TMF	10	38	7–16
GRIMALDI et al, 2018	Reino Unido	randomizado, duplo-cego e controlado por placebo	prebiótico	6	26	4–11
SANCTUARY et al, 2019	Estados Unidos	randomizado, duplo-cego e cruzado	probiótico e PCB	5	8	2–11
KANG et al, 2019	Estados Unidos	aberto, sem grupo controle	TMF	10	18	7–16
LIU et al, 2019	Taiwan/ China	randomizado, duplo-cego e controlado por placebo	probiótico	4	71	7–15
ARNOLD et al, 2019	Estados Unidos	simples-cego, randomizado e cruzado	probiótico	8	10	3–12
WANG et al, 2020 (fase 2)	China	duplo-cego, controlado por placebo	probiótico e FOS	15,4	11	2–8
KANG et al, 2020	Estados Unidos	aberto, sem grupo controle	TMF	10	18	7–16
KONG et al, 2021	Estados Unidos	randomizado, duplo-cego e controlado por placebo	probiótico e ocitocina	28	27	3–20
STEWART CAMPBELL et al, 2022	Nova Zelândia e Austrália	aberto, sem grupo controle	adsorvente de carbono	8	24	12–17
SHERMAN et al, 2022	Estados Unidos	randomizado, duplo-cego e controlado por placebo	probiótico	16	27	3–25
RAGHAVAN et al, 2023	Índia	randomizado, aberto, com grupo controle	polissacarídeos e beta glucano	12,8	13	3–18
ALLAN et al, 2024	Estados Unidos	aberto, sem grupo controle	dieta cetogênica	17,4	7	7–19
HRNCIAROVA et al, 2024	República Tcheca	randomizado, duplo-cego e controlado por placebo	extrato de sangue bovino	13	27	3–7

*Refere-se à soma de todos os participantes, tanto de grupo de intervenção quanto de grupo controle, que completaram o estudo. PCB = produto de colostro bovino. FOS = frooligossacarídeos. TMF = transplante de microbiota fecal.

Figura 4 – Variação do tamanho amostral

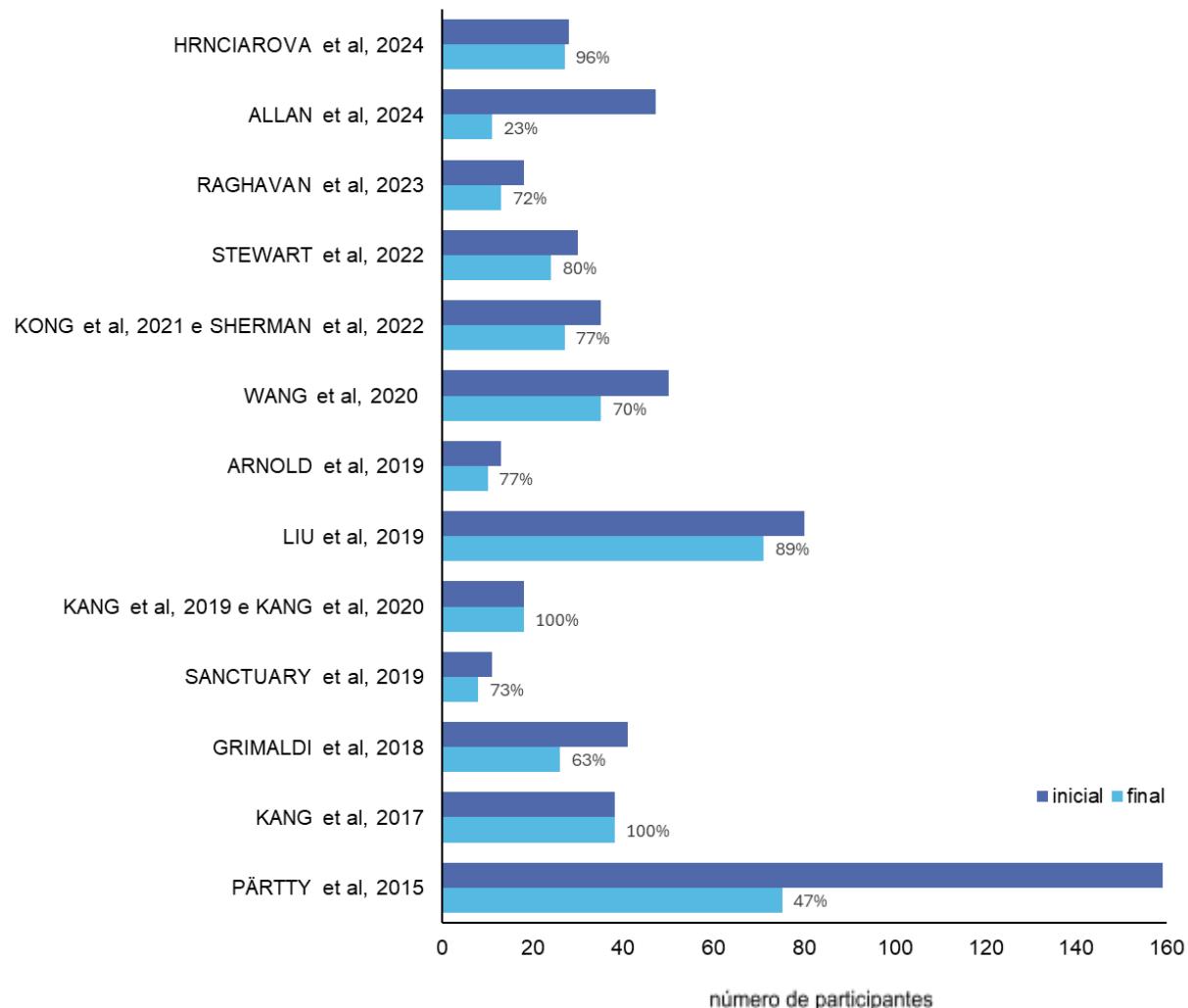


Gráfico elaborado no Excel com dados extraídos dos artigos selecionados.

Tabela 4 — Metodologias analíticas dos artigos selecionados

Estudo	Intervenção	Avaliações GI e comportamentais	Análises laboratoriais
PÄRTTY <i>et al</i> , 2015	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ICD-10	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana amostras de sangue tipo de grupo sanguíneo secretor
KANG <i>et al</i> , 2017; KANG <i>et al</i> , 2019; KANG <i>et al</i> , 2020	Terapia de transferência de microbiota	ABC* ADI-R CARS Escala de fezes de Bristol* GSRS* PGI-III* SRS* VABS-II*	amostras de fezes e swabs fecais detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana sequenciamento de DNA viral análise metabólica amostras de sangue análise metabólica
GRIMALDI <i>et al</i> , 2018	Bimuno® galactooligosacarídeo	AQ* ATEC* Diários de sono* Escala de fezes de Bristol* EQ-SQ* Questionários de função e sintomas GI* Registros de diário alimentar* SCAS-P*	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana análise metabólica atividade bifidogênica amostras de urina análise metabólica
SANCTUARY <i>et al</i> , 2019	<i>Bifidobacterium infantis</i> Produto de colostro bovino	ABAS-II* ABC* Escala de fezes de Bristol* GIH* QPGS-RIII* RBS-R*	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana análise metabólica
LIU <i>et al</i> , 2019	<i>Lactobacillus plantarum</i> PS128	ABC-T* CBCL* CGI-I CGI-S SNAP-IV* SRS*	Não aplicável

Estudo	Intervenção	Avaliações GI e comportamentais	Análises laboratoriais
ARNOLD <i>et al</i> , 2019	VISBIOME® 8 espécies probióticas, principalmente <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i>	ABC* Avaliação de sintomas alvo** CSHQ-A* PedsQL-módulo gastrointestinal* PSI* PRAS-ASD* SRS*	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana abundâncias familiares relativas amostras de sangue níveis de alfa-sinucleína melatonina sérica
WANG <i>et al</i> , 2020 (fase 2)	Duas espécies de <i>Bifidobacterium</i> Duas espécies de <i>Lactobacillus</i> Frutooligossacarídeos	6-GSI* ATEC*	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana medição de AGCC amostras de sangue neurotransmissores plasmáticos
KONG <i>et al</i> , 2021; SHERMAN <i>et al</i> , 2022	<i>Lactobacillus</i> plantarum PS128 Ocitocina	ABC* CGI GSI* SRS*	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana redes de co-ocorrência amostras de sangue marcadores inflamatórios nível de ocitocina autoanticorpos CO-oxímetro saturação de carboxiemoglobina
STEWART CAMPBELL <i>et al</i> , 2022	Molécula AB-2004	6-GSI* ABC* BSS* CASI-5* CGI-I CGI-S GSRS* NRS* PARS RBS-R* SRS-2* VABS-3	amostras de sangue análise metabólica amostras de urina análise metabólica ressonância magnética funcional

Estudo	Intervenção	Avaliações GI e comportamentais	Análises laboratoriais
RAGHAVAN <i>et al</i> , 2023	Nichi Glucan beta glucano produzido por <i>Aureobasidium pullulans</i> AFO-202	CARS CSHQ-A*	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana amostras de sangue nível de alfa-sinucleína nível de melatonina
ALLAN <i>et al</i> , 2024	Óleo de triglicerídeo de cadeia média	ADOS-2 CARS-2	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana quantificação do gene da butirato quinase amostras de sangue marcadores inflamatórios níveis de corpos cetônicos
HRNCIAROVA <i>et al</i> , 2024	Juvenil® aminoácidos livres pequenas proteínas oligopeptídeos nucleotídeos fosfolipídios	CARS-2-Standard Version	amostras de fezes detecção e quantificação bacteriana diversidade microbiana

Questionários assinalados com asterisco foram respondidos pelos pais/responsáveis dos participantes, enquanto os demais foram respondidos por profissionais clínicos. **A avaliação de sintomas alvo (ARNOLD *et al.*, 2019) foi primeiramente determinada pelos pais/responsáveis com o auxílio de um clínico, seguida de uma classificação feita por um painel de clínicos cegos. 6-GSI = Six-item Gastrointestinal Severity Index; ABAS = Adaptive Behavior Assessment System; ABC = Aberrant Behavior Checklist; ABC-T = Autism Behavior Checklist-Taiwan version; ADOS-2 = Autism Diagnostic Observation Schedule - 2nd edition; AQ = Autism Spectrum Quotient; ATEC = Autism Treatment Evaluation Checklist; BSS = Brief Social Skills; CARS = Childhood Autism Rating Scale; CASI-5 = 5-item Childhood Anxiety Sensitivity Index; CBCL = Child Behavior Checklist; CGI = Clinical Global Impression; CGI-I = Clinical Global Impression-Improvement; CGI-S = Clinical Global Impression-Severity; CSHQ-A = Children's Sleep Habits Questionnaire-abbreviated; EQ-SQ = Empathy and Systemising Quotient; GIH = CHARGE Gastrointestinal History; GSI = Gastrointestinal Severity Index; GSRS = Gastrointestinal Symptom Rating Scale; ICD-10 = International Classification of Diseases 10th; PARS = Pediatric Anxiety Rating Scale; PedsQL = Pediatric Quality of Life Inventory; PGI-III = Parent Global Impressions-III; PRAS-ASD = Parent-Rated Anxiety Scale for ASD; PSI = Parenting Stress Index; QPGS-RIII = Questionnaire on Pediatric Gastrointestinal Symptoms-Rome III Version; RBS-R = Repetitive Behavior Scale-Revised; RBS-R: Repetitive Behavior Scale-Revised; SCAS-P = Spence's Children Anxiety Scale-Parent version; SNAP-IV = Swanson, Nolan, and Pelham-IV-Taiwan version; SRS = Social Responsiveness Scale; VABS = Vineland Adaptive Behavior Scale.

4.3. Probiótico

De acordo com a definição da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (HILL *et al.*, 2014).

No caso, sete artigos optaram por alguma forma de intervenção com probióticos, dos quais três estudos também avaliam uma combinação com algum suplemento.

Pärty *et al.* (2015) apresenta um estudo de acompanhamento, depois de 13 anos, em que é feita a análise do número de participantes diagnosticados com Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) e/ou Síndrome de Asperger (SA), dentre as 75 crianças que receberam, durante os seis primeiros meses de vida, de maneira randomizada, um probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* GG) ou placebo. TDAH ou SA não foi diagnosticado nas crianças que receberam o probiótico, e foi diagnosticado em seis crianças que receberam placebo, ou seja, 17,1% do grupo controle ($p = 0,008$).

A composição da microbiota intestinal dos participantes foi analisada nas idades de 3 semanas, 3, 6, 12, 18, 24 meses e 13 anos. Ao comparar o desenvolvimento composicional da microbiota das crianças com e sem algum dos transtornos neuropsiquiátricos, observou-se que, durante os seis primeiros meses de vida, o número médio de espécies de *Bifidobacterium* nas fezes das crianças afetadas era significativamente menor ($8,26 \pm 1,24$ log de células/g) do que nas crianças saudáveis ($9,12 \pm 0,64$ log de células/g) ($p = 0,03$) (Pärty *et al.*, 2015). Todavia, na idade de 13 anos, não houve diferenças estatisticamente significativas na composição da microbiota intestinal.

Sanctuary *et al.* (2019) traz um ensaio clínico duplo-cego, cruzado e randomizado, com 8 crianças com TEA e comorbidades GI, e investiga os seguintes tratamentos: a combinação de um probiótico (*Bifidobacterium infantis*) com um produto de colostro bovino (BCP), que serve como uma fonte de oligossacarídeos prebióticos, e a intervenção apenas com o BCP. O tratamento conjunto foi considerado bem tolerado, sendo o efeito colateral mais comum o de gases leves.

Acerca dos sintomas gastrointestinais, de acordo com os testes GIH

(*CHARGE Gastrointestinal History* - Histórico gastrointestinal de CHARGE) e QPGS-RIII (*Questionnaire on Pediatric Gastrointestinal Symptoms - Rome III Version* - Questionário sobre sintomas gastrointestinais pediátricos - Versão Roma III) aplicados aos pais, 87,5% do participantes (7 de 8) apresentaram algum nível de melhora nos sintomas durante o tratamento com apenas BCP, enquanto que no tratamento combinado 100% dos participantes relataram alguma melhora nos sintomas GI. Houve uma redução na frequência de dor associada à evacuação, tanto no tratamento exclusivo com BCP ($p = 0,044$), quanto no tratamento combinado ($p = 0,020$). Entretanto, a outra redução sintomática significativa, isto é, na frequência de diarreia, é observada apenas no tratamento exclusivo ($p = 0,021$).

Já a respeito de comportamentos atípicos, foram aplicados os testes ABC (*Aberrant Behavior Checklist* – Lista de verificação de comportamento aberrante), RBS-R (*Repetitive Behavior Scale-Revised* – Escala de comportamento repetitivo-revisada) e ABAS-II (*Adaptive Behavior Assessment System-Second Edition* – Sistema de Avaliação de Comportamento Adaptativo-Segunda Edição). Sanctuary *et al.* (2019) não observou nenhuma diferença nos comportamentos adaptativos ou repetitivos, com base no teste ABAS-II e no RBS-R, respectivamente. Todavia, uma redução significativa em certos comportamentos, como irritabilidade ($p = 0,003$), estereotipia ($p = 0,006$) e hiperatividade ($p = 0,007$), foi observada no tratamento exclusivo de BCP, de acordo com os resultados do questionário ABC, ao passo que o tratamento combinado apresentou uma redução significativa apenas na letargia ($p = 0,0499$).

A análise de diversidade beta, realizada através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada em distâncias UniFrac ponderadas e não ponderadas, não revelou alterações globais significativas no microbioma fecal, em qualquer um dos tratamentos.

Ademais, Sanctuary *et al.* (2019) observou redução significativa na frequência de células T CD4+ que expressam Interleucina-13 (IL-13) - importante em respostas alérgicas - no tratamento combinado ($p=0,006$), e na frequência de células T CD8+ que expressam Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) no tratamento com apenas BCP ($p = 0,024$), indícios de sinais pró-inflamatórios diminuídos. Não foram observadas mudanças globais nos perfis metabólicos fecais, urinários ou séricos de

acordo com o tratamento.

Liu *et al.* (2019) realizou um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo com o probiótico *Lactobacillus plantarum* PS128. Ao final do estudo realizado apenas com meninos, 36 crianças haviam recebido o probiótico PS128 e 35, placebo por 4 semanas. Os resultados foram baseados em relatórios clínicos e questionários respondidos pelos pais, sem incluir uma análise da microbiota. Para o teste ABC-T (*Autism Behavior Checklist-Taiwan version* – Lista de verificação de comportamento aberrante-versão de Taiwan), apenas observou-se uma tendência de melhora para o aspecto do uso do corpo e de objetos no grupo PS128 ($p= 0,04$), enquanto que para a SRS (*Social Responsiveness Scale* – Escala de Resposta social), observou-se uma pequena redução da pontuação total no grupo probiótico ($p= 0,04$). Com relação a CBCL (*Child Behavior Checklist* – Lista de verificação de comportamento infantil), a pontuação total no grupo probiótico apresentou diferença significativa, com redução nas pontuações de ansiedade ($P = 0,02$) e de comportamentos de quebra de regras ($P = 0,02$), ao passo que o grupo placebo mostrou uma redução na pontuação de problemas relacionados à externalização ($P = 0,02$) - tendência não observada no grupo probiótico. Já no teste SNAP-IV (*Swanson, Nolan, and Pelham-IV-Taiwan version* – Swanson, Nolan e Pelham-IV-versão de Taiwan), foram observadas reduções na pontuação total ($P = 0,01$), na hiperatividade e impulsividade ($P = 0,04$) e na oposição e desafio ($P = 0,045$) somente no grupo PS128.

Além disso, os autores dividiram os participantes em dois grupos etários: 7 a 12 anos e 13 a 15 anos. Tal divisão evidenciou, no caso das crianças de menor faixa etária, melhorias significativas no questionário SNAP-IV para o grupo PS128 em comparação ao grupo probiótico: desatenção ($p = 0,03$), hiperatividade/impulsividade ($p = 0,02$), oposição/desafio ($p = 0,02$) e pontuação total ($p = 0,004$), indicando que as crianças mais novas se beneficiaram mais da suplementação com o probiótico PS128.

Kong *et al.* (2020) realizou um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo com o probiótico *Lactobacillus plantarum* PS128. O ensaio foi dividido em 2 estágios: os 27 participantes receberam o probiótico ou um placebo por 28 semanas, e ambos os grupos receberam a partir da décima-sexta semana ocitocina

(OCT), um neuropeptídeo produzido pelo hipotálamo, que apresenta papel periférico como hormônio, e um papel central como neurotransmissor e neuromodulador. Assim, a OCT está envolvida em comportamentos como a formação de vínculos afetivos, a confiança, a sociabilidade e a redução da ansiedade (JUREK; NEUMANN, 2018).

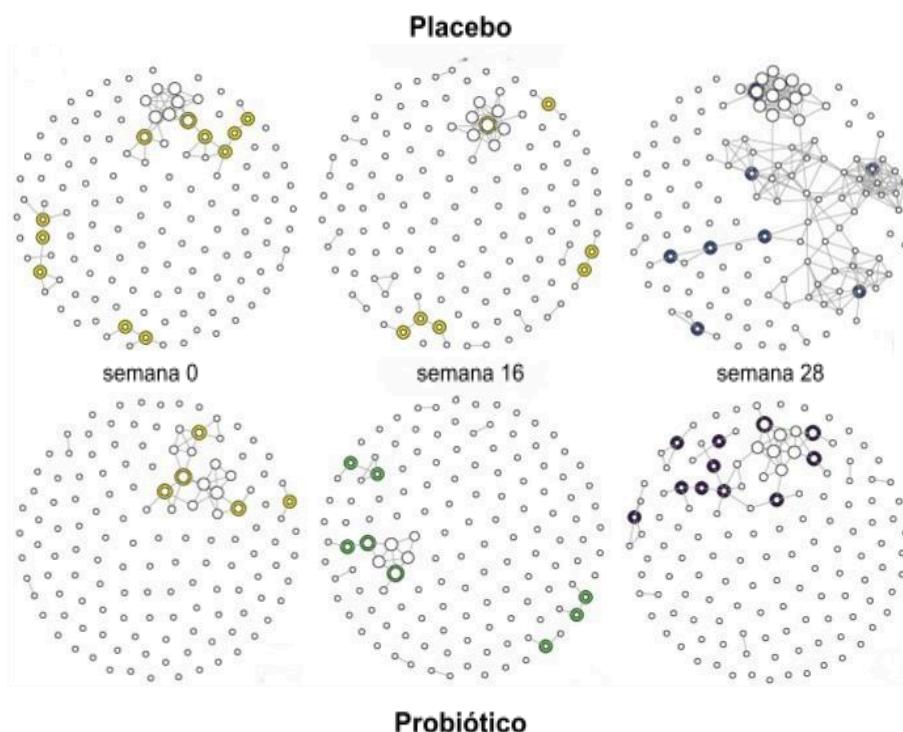
De maneira geral, os autores verificaram uma ação sinérgica do probiótico com a ocitocina. Através dos testes ABC e SRS observou-se apenas uma tendência de melhora comportamental, no caso do uso combinado do probiótico com OCT, na pontuação total de ABC ($p = 0,077$), na pontuação de comportamento estereotipado de ABC ($p = 0,069$), e na pontuação de cognição de SRS ($p = 0,059$), sem diferenças significativas. Já na análise feita através da escala CGI (*Clinical Global Impression* – Impressão Clínica Global), observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na proporção de indivíduos com algum grau de melhora nos sintomas do TEA no grupo do tratamento combinado probiótico + OCT, em comparação com o grupo controle.

O estudo avaliou ainda se houve melhora dos sintomas gastrointestinais pelo questionário GSI (*Gastrointestinal Severity Index* – Índice de Gravidade Gastrointestinal), o qual não demonstrou mudanças significativas em nenhum tratamento, seja apenas o probiótico, o probiótico em conjunto com OCT ou só OCT, quando comparados ao grupo placebo.

As medidas de alfa e beta diversidade do microbioma gastrointestinal não apresentaram mudanças significativas. No entanto, através da ferramenta SparCC (*Sparse Correlations for Compositional data* – correlações esparsas para dados compostionais) para analisar as interações entre os microrganismos em nível de gênero, verificou-se um aumento significativo de linhas e bordas das conexões nas redes de co-ocorrência (Figura 5), tanto no grupo OCT sozinho ($p < 0,001$) quanto no grupo da combinação ($p < 0,005$).

Uma análise *post hoc* deste intervenção foi feita usando as amostras e os dados das primeiras 16 semanas do ensaio (SHERMAN *et al.* 2022). Este estudo explorou o nível de carboxihemoglobina (SpCO) dos participantes, e as correlações com autoanticorpos, marcadores séricos inflamatórios, nível sérico de OCT, perfil do

Figura 5 — Redes de co-ocorrência entre microbiota intestinal em nível de gênero para grupo placebo e grupo probiótico ao longo do tempo



Os pontos de articulação são marcados como halos ao redor do nó. A pontuação do *hub* (polo) é indicada pelo tamanho do nó. As cores indicam diferentes gêneros bacterianos. Limite de magnitude de correlação do SparCC = 0,7. Semana 0 = início da intervenção com probiótico ou placebo; semana 16 = início da intervenção com ocitocina para ambos os grupos; semana 28 = fim das intervenções.

Imagen adaptada de Kong *et al.* (2021)

microbioma, gravidade dos sintomas gastrointestinais, gravidade dos sintomas principais do TEA e a resposta ao tratamento probiótico. O nível de SpCO foi positivamente correlacionado com a pontuação total do questionário SRS basal ($R = 0,38$, $p = 0,029$), ou seja, SpCO se correlaciona com a gravidade do TEA ($R = 0,38$; $p = 0,029$), tornando-se um alvo interessante no campo de diagnósticos. A mudança de SpCO observada após a intervenção foi positivamente correlacionada com o nível sérico do autoanticorpo anti-lisogangliosídeo GM1 no grupo probiótico ($R = 0,83$; $p = 0,022$), mas não no grupo placebo ($R = -0,55$; $p = 0,11$). Isso sugere que indivíduos com menor nível de GM1 apresentaram uma melhora maior na redução de SpCO, possivelmente devido ao tratamento com PS128.

Arnold *et al.* (2019) conduziu um estudo cruzado, simples-cego, com 10 crianças diagnosticadas com TEA, sintomas gastrointestinais e ansiedade,

alternando o uso de VISBIOME® (composto por oito espécies probióticas, principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) com placebo, com intervalo de 3 semanas para *wash-out*.

Determinadas medidas clínicas avaliadas mostraram algum grau de melhora na intervenção com probiótico em comparação com o placebo. No caso do teste PedsQL (*Pediatric Quality of Life Inventory* – Inventário de Qualidade de Vida Pediátrica) GI total, pontuações mais altas significam mais qualidade de vida, e a diferença entre a alteração no grupo probiótico e a alteração no grupo placebo foi positiva (5,76), indicando um resultado melhor com VISBIOME®. Já para os testes PRAS-ASD (*Parent-Rated Anxiety Scale for ASD* – Escala de ansiedade avaliada pelos pais para TEA), subescalas ABC, estresse total do PSI (*Parenting Stress Index* – Índice de Estresse Parental), SRS total e CSHQ-A (*Children's Sleep Habits Questionnaire abbreviated* – Questionário de Hábitos de Sono das Crianças abreviado), pontuações mais baixas indicam melhora sintomática, portanto uma diferença negativa entre os grupos indica resultados melhores com o probiótico, o que foi observado para a escala de ansiedade (-0,82), de responsividade social (-3,07) e em duas subescalas de ABC (-0,43). Contudo, nenhuma das diferenças de resposta avaliadas pelo estudo atingiu significância estatística.

Não foi observada nenhuma alteração específica na diversidade alfa ou na composição de famílias bacterianas da microbiota intestinal associada ao tratamento. Apesar disso, a abundância relativa de *Lactobacillus* OTU GM884480.1.1531 apresentou uma correlação significativa com a pontuação PedsQL ($R = 0,574$, $p = 0,022$) (ARNOLD *et al.*, 2019).

A pesquisa de Wang *et al.* (2020) foi dividida em duas fases: a primeira comparou o perfil da microbiota intestinal e os níveis de certos neurotransmissores plasmáticos em crianças com TEA e crianças neurotípicas; e a segunda fase, focada no grupo de crianças com autismo, consistiu em uma intervenção com um probiótico contendo duas espécies de *Bifidobacterium* e duas espécies de *Lactobacillus*, juntamente com fruooligossacarídeo (FOS), um fator de crescimento para *Bifidobacterium*. A segunda etapa foi um estudo duplo-cego, controlado por placebo, com 11 participantes, e teve uma duração de 108 dias.

A resposta clínica foi avaliada através das pontuações nos testes ATEC (*Autism treatment evaluation checklist* – Lista de verificação de avaliação do tratamento do autismo) e 6-GSI (*Six-item Gastrointestinal Severity Index* – Índice de gravidade gastrointestinal de seis itens) ao longo do tempo (Tabela 5). Observou-se, para o grupo suplementado com probiótico + FOS, uma redução significativa na gravidade dos sintomas nas subescalas ATEC de fala/linguagem/comunicação e sociabilidade, assim como uma diminuição significativa nas pontuações gerais deste teste. O grupo probiótico apresentou melhora significativa para a pontuação total do 6-GSI, com destaque para a redução nas pontuações dos sintomas constipação, diarreia e cheiro de fezes.

A despeito da análise da microbiota intestinal, Wang *et al.* (2020) comparou a diversidade alfa quantificada pelos índices de Simpson, Shannon, OTUs observadas e Chao1 antes e após a intervenção, tendo como grupo controle a microbiota das crianças neurotípicas analisada na primeira fase do estudo. Inicialmente, a diversidade alfa do grupo autista era significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$), porém os índices de diversidade alfa para o grupo probiótico + FOS diminuíram gradualmente e se aproximaram dos índices do grupo controle (Figura 6.I). Os autores também avaliaram a diversidade beta, utilizando distâncias UniFrac não ponderadas, e observaram que a microbiota no grupo probiótico foi distinta entre a linha de base do estudo e o 108º dia (Figura 6.II).

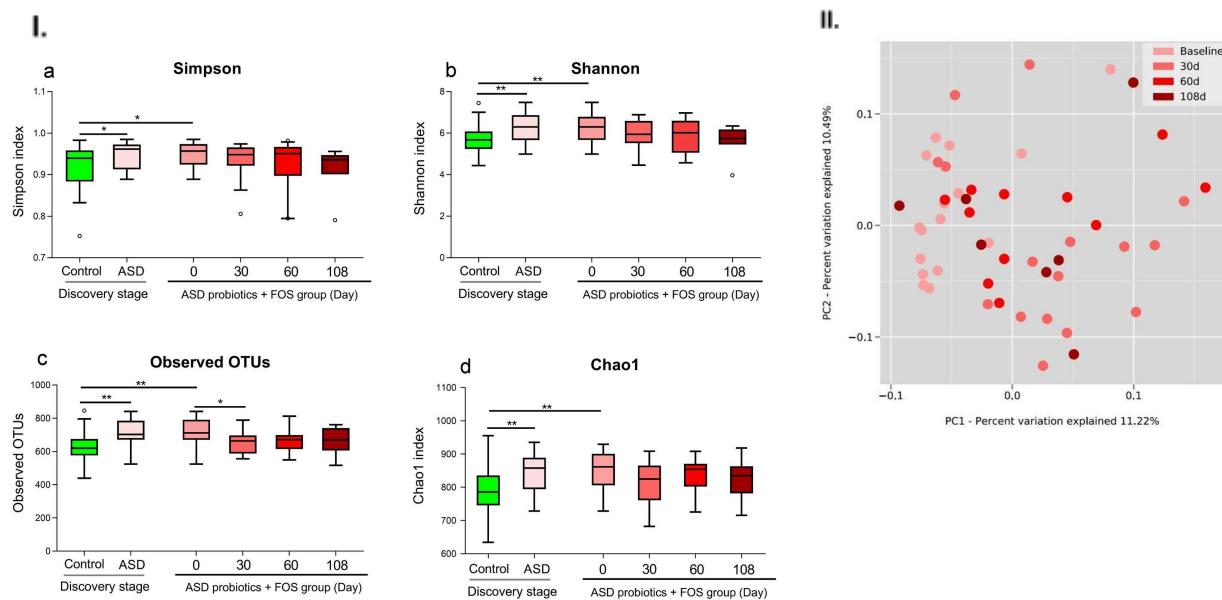
Adicionalmente, as concentrações fecais de ácidos graxos de cadeia curta dos participantes foram analisadas, e constatou-se que as concentrações de ácido acético, butírico e propiônico foram significativamente menores nas fezes de crianças com TEA antes da intervenção com probióticos + FOS, em comparação ao grupo de controle. Após a intervenção, houve um aumento significativo desses AGCC nas fezes, alcançando níveis semelhantes ao grupo controle. Em contrapartida, o grupo de crianças com TEA que recebeu placebo não apresentou mudanças nos níveis de AGCC ao longo do tempo.

Tabela 5 — Análise dos sintomas clínicos nas crianças com TEA no grupo probiótico + FOS e no grupo placebo

Grupo TEA antes da suplementação probiótica (Linha de base ou dia 0)	Grupo TEA após suplementação probiótica (valor de p)			Grupo TEA antes da suplementação com placebo (Linha de base ou dia 0)	Grupo TEA após suplementação com placebo (valor de p)		
	30 dias	60 dias	108 dias		30 dias	60 dias	108 dias
Subescalas ATEC							
Fala/linguagem/ comunicação	19,45 ± 1,26	17,25 ± 1,24 (0,23)	13,38 ± 1,41 (0,003)	10,78 ± 1,07(<0,001)	18,2±1,77	17,28±1,84 (0,73)	14,71±1,73 (0,19)
Sociabilidade	22,75 ± 1,96	19,0 ± 1,79 (0,17)	15,92 ± 1,67 (0,016)	15,33 ± 1,80 (0,019)	22,0±2,51	19,57±2,84 (0,54)	22,7±2,14 (0,84)
Consciência sensorial/cognitiva	21,25 ± 1,67	19,82 ± 1,61 (0,54)	17,54 ± 1,76 (0,14)	17,0 ± 2,26 (0,14)	20,60±2,57	21,57±3,48 (0,82)	20,14±1,77 (0,89)
Saudável/físico/ comportamento	21,63 ± 2,72	17,63 ± 2,29 (0,27)	20,85 ± 2,62 (0,84)	17,33 ± 2,91(0,32)	17,40±2,78	17,71±2,53(0,94)	16,86±1,72 (0,88)
Pontuação total ATEC	85,06 ± 5,72	73,70 ± 5,54 (0,16)	67,69 ± 5,51 (0,04)	59,33 ± 6,52 (0,009)	78,20±5,49	76,14±2,98 (0,77)	74,43±3,65 (0,61)
Itens de pontuação de 6-GSI							
Constipação	1,25 ± 0,25	0,50 ± 0,16(0,017)	0,38 ± 0,14(0,008)	0,22 ± 0,15 (0,008)	0,8±0,25	1,25±0,25(0,23)	1,14±0,14(0,31)
Diarreia	0,50± 0,16	0,25 ± 0,11(0,21)	0,08 ± 0,08 (0,03)	0,00 ± 0,0(0,03)	0,3±0,21	0,25±0,16 (0,86)	0,14±0,14 (0,59)
Consistência das fezes	0,37 ± 0,20	0,13 ± 0,09 (0,26)	0,00 ± 0,0 (0,11)	0,0 ± 0,0 (0,18)	0,5±0,22	0,5±0,26 (0,99)	0,43±0,20 (0,82)
Cheiro das fezes	1,18 ± 0,16	0,56 ± 0,18(0,01)	0,54 ± 0,14(0,007)	0,44 ± 0,18 (0,01)	0,8±0,25	0,63±0,26(0,63)	0,57±0,30 (0,56)
Flatulência	1,18 ± 0,21	0,68 ± 0,22 (0,11)	0,62 ± 0,21(0,07)	0,67 ± 0,17 (0,10)	0,8±0,25	0,5±0,27(0,42)	0,57±0,30 (0,56)
Dor abdominal	0,44 ± 0,16	0,18 ± 0,10 (0,19)	0,15 ± 0,10 (0,16)	0,11 ± 0,11 (0,16)	0,6±0,22	0,38±0,26(0,52)	0,43±0,20 (0,59)
Pontuação total 6-GSI	4,88 ± 0,43	2,31 ± 0,44 (0,002)	2,39 ± 0,56(0,001)	1,44 ± 0,38(<0,001)	3,8±0,46	3,5±0,87(0,75)	3,29±0,92(0,59)
2,5±0,5(0,14)							

Os resultados são expressos como média ± erro padrão (valor de p). ATEC = Autism treatment evaluation checklist; 6-GSI = 6-item Gastrointestinal Severity Index. Dados traduzidos das tabelas 1 e S1 de WANG *et al.* (2020) e unificados no Excel.

Figura 6 – Análises de diversidade alfa e beta da microbiota intestinal do grupo probiótico + FOS ao longo do tempo



I. Comparação da diversidade alfa da microbiota intestinal entre os grupos TEA e controle, bem como o grupo TEA de intervenção probióticos + FOS na linha de base, em 30 dias, 60 dias e 108 dias; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. II. Análise de coordenadas principais da diversidade beta bacteriana com base nas distâncias UniFrac não ponderadas na linha de base e depois da intervenção probiótica + FOS em 30 dias, 60 dias e 108 dias; PCoA= Principal Coordinate Analysis.

Imagen composta pela junção de figuras do artigo de Wang *et al.*, 2020.

4.4. Suplementos

Foram incluídos quatro estudos em que a intervenção consistiu em modular a microbiota através do fornecimento de ingredientes específicos para o desenvolvimento de um ecossistema mais saudável.

Grimaldi *et al.* (2018) realizou um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, com 26 participantes, sendo que 14 crianças tinham uma dieta livre e 12 seguiam dietas restritivas, na maioria das vezes excluindo caseína e glúten. Cada um desses dois grupos dietéticos foram subdivididos, de forma que parte das crianças receberam placebo e outra parte o prebiótico Bimuno® galacto-oligossacarídeo (B-GOS).

Na linha de base do estudo, já foi possível observar que as dietas de exclusão tinham um impacto significativo em sintomas gastrointestinais, com pontuações significativamente menores de dor abdominal ($p < 0,05$) e evacuação ($p < 0,001$). Após a intervenção, constatou-se uma tendência geral de redução em

problemas GI, mas as diferenças entre os tratamentos não foram significativas. Acerca da análise do sono para quem recebeu o prebiótico, 23% dos participantes, isto é, duas crianças do grupo de dieta livre e uma de dieta restrita, foram beneficiadas.

Observou-se uma melhora significativa nas pontuações de comportamento social depois da intervenção de B-GOS no grupo de dieta restrita, com os resultados da escala de habilidades sociais do questionário AQ (*Autism Spectrum Quotient – Quociente do Espectro Autista*) ($p < 0,05$) refletindo as melhorias no comportamento antissocial do questionário ATEC ($p = 0,05$).

Não houve efeito estatisticamente significante dos tratamento ou dietas, ou da sua interação na atividade bifidogênica do prebiótico B-GOS, apesar do número de *Bifidobacterium spp.* ter aumentado após a intervenção.

Ainda, a intervenção com B-GOS levou a alterações significativas nos perfis metabólicos urinários das crianças com TEA com dietas livres, e continham maiores quantidades de creatinina, creatina, dimetilglicina, dimetilalanina, carnitina, citrato, adipato e N-óxido de trimetilamina, quando comparadas às crianças tomando placebo. Mudanças metabólicas também foram observadas em amostras fecais após a intervenção prebiótica, sendo que etanol, dimetilglicina e AGCC (butirato, valerato) foram positivamente correlacionados com a ingestão de B-GOS. Aumentos na produção de butirato também foram detectados em crianças com TEA no grupo de dietas restritas; no entanto, essas mudanças não foram significativas. Ademais, níveis mais baixos de aminoácidos (isoleucina, leucina, valina, alanina, glutamina) e lactato foram detectados no grupo prebiótico, em comparação ao placebo.

No estudo randomizado aberto apresentado em Raghavan *et al.* (2023), os treze participantes foram divididos em dois grupos, em que um recebeu o tratamento convencional, que englobava terapias comportamentais e L-carnosina, enquanto o outro recebeu, além do tratamento convencional, o suplemento de beta glucano Nichi Glucan, produzido pela *Aureobasidium pullulans* (levedura preta) cepa AFO-202.

Em análises anteriores referentes a esse ensaio clínico, relatou-se, por meio do teste CARS (*Childhood Autism Rating Scale – Escala de Classificação do Autismo Infantil*), uma melhora significativa no comportamento de todos os

participantes do grupo que recebeu beta-glucano ($p = 0,034$), enquanto que o teste CSQH-A também indicou uma melhoria na qualidade e no padrão de sono em oito dos nove participantes desse grupo (RAGHAVAN *et al.*, jan. 2022). Além disso, observou-se no grupo do suplemento um aumento dos níveis plasmáticos da proteína alfa-sinucleína - um neurotransmissor pré-sináptico associado a vários distúrbios neurodegenerativos (RAGHAVAN *et al.*, set. 2022).

Assim, o artigo de 2023 de Raghavan *et al.* focou na avaliação da microbiota, por meio do sequenciamento do genoma completo. A diversidade alfa, medida pelo índice de Shannon, não mostrou mudanças significativas. O único gênero a apresentar uma diferença significativa na abundância pós-intervenção foi *Enterobacter*, que diminuiu no grupo beta glucano enquanto aumentou no grupo controle ($p=0,045$). Bactérias *Enterobacteriaceae* secretam curli, proteína amilóide da superfície celular, a qual causa o dobramento incorreto da α -sinucleína (RAGHAVAN *et al.*, 2023). Por fim, a abundância de espécies aumentou no grupo beta glucano após a intervenção.

Allan *et al.* (2024) realizou um estudo aberto em que sete participantes seguiram uma dieta cetogênica por 4 meses, com o consumo de os carboidratos líquidos diários totais limitados a 20–25 gramas e uma suplementação de óleo de triglicerídeo de cadeia média. Essa escolha deveu-se ao fato de que corpos cetônicos, como o β -hidroxibutirato, conseguem cruzar a barreira hematoencefálica e podem ter efeitos neuroprotetores. Como o ácido graxo de cadeia curta butirato, produzido no intestino, compartilha semelhanças com o β -hidroxibutirato, ele tem sido considerado um suplemento potencial para TEA.

Uma publicação anterior a respeito do mesmo ensaio (LEE *et al.*, 2018), analisou os desfechos comportamentais, observando-se no teste ADOS-2 (*The Autism Diagnostic Observation Schedule, 2nd edition* – Cronograma de Observação de Diagnóstico do Autismo, 2^a edição) melhora significativa nas pontuações de comparação ($p = 0,006$), pontuações totais gerais ($p = 0,020$) e pontuações de afeto social ($p = 0,006$) após três meses de intervenção, enquanto que para o teste CARS-2 foram significativos os itens: imitação ($p = 0,031$), uso do corpo ($p = 0,008$) e medo ou nervosismo ($p = 0,039$).

Para averiguar o *status* cetogênico dos participantes, Allan *et al.* (2024) mediu

os níveis plasmáticos de corpos cetônicos, e então observaram um aumento significativo na concentração de ácido acetoacético ($p = 0,02$) e ácido hidroxibutírico ($p = 0,02$) após a intervenção dietética.

Através da análise da microbiota intestinal, pode-se observar alterações na composição a nível de filo, assim como um aumento estatisticamente significativo na alfa diversidade, medida através dos índices de Shannon e Simpson, a nível de família, gênero e espécie. Não houve mudança significativa no nível de filo, mas pode-se observar alterações significativas em níveis taxonômicos mais baixos. Portanto, a dieta cetogênica promoveu uma distribuição mais uniforme e aumento da riqueza da microbiota intestinal.

Em outro artigo sobre este ensaio (MU *et al.*, 2020), dosou-se metabólitos sanguíneos e oligoelementos, antes e depois da intervenção dietética, com um aumento significativo nos níveis de β -hidroxibutirato plasmático ($p = 0,05$). Allan *et al.* (2024) então examinou as amostras de fezes a despeito da capacidade de produção do AGCC butirato, sendo que a abundância para o gene da butirato quinase e seus níveis de expressão aumentaram significativamente após o tratamento ($p = 0,039$ para níveis de DNA BUK em relação ao DNA 16S; $p = 0,007$ para níveis de RNA BUK em relação ao RNA 16S), indicando que as alterações na microbiota intestinal afetaram os metabólitos sanguíneos.

A análise de marcadores inflamatórios no plasma constatou uma tendência generalizada de diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, com a diminuição significativa dos níveis de IL-1 β e IL-12p70 (ALLAN *et al.*, 2024).

Hrnciarova *et al.* (2024) conduziu um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo com um extrato de sangue bovino, denominado Juvenil®, suplemento alimentar que demonstrou, em estudos recentes, atuar na modulação da composição da microbiota intestinal (BOSTIK; KUBELKOVÁ; MACELA, 2023). A pesquisa incluiu um total de 27 participantes, contando com um grupo placebo de crianças autistas e um grupo controle de crianças neurotípicas.

Para a avaliação da microbiota intestinal, mediu-se a diversidade beta, através da PCoA, observando-se uma diferença significativa na composição da microbiota entre os participantes neurotípicos e os pacientes TEA antes de qualquer tratamento ($p = 0,001$). Por outro lado, não houve diferença significativa na

composição da microbiota numa comparação dos pacientes autistas após o tratamento com Juvenil® com o grupo controle ou com os pacientes autista antes do tratamento. Também não foram observadas diferenças significativas nos filos bacterianos da microbiota intestinal ao comparar os períodos antes e depois do tratamento com placebo ou suplemento.

O desfecho comportamental da intervenção foi avaliado utilizando o teste CARS-2-ST (versão padrão). Verificou-se uma diminuição dos sintomas do autismo (redução de 12.6% no grupo suplementado, redução de 6.6% no grupo placebo), mas nenhuma mudança atingiu significância estatística (grupo placebo $p = 0,62$, grupo Juvenil® $p = 0,19$).

Além disso, este estudo analisou a correlação entre a abundância de determinados gêneros bacterianos, previamente associados ao autismo por outros autores, e os resultados do teste CARS-2-ST. Os gêneros que apresentaram os maiores coeficientes de correlação positiva com a pontuação total do teste, ou seja, indicando uma relação com sintomas mais graves do autismo, foram *Prevotella*, *Escherichia/Shigella*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Alistipes* e *Bifidobacterium*. Em contrapartida, uma correlação negativa foi observada para *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Barnesiella* e *Blautia*, indicando uma relação com melhora sintomática.

4.5. Transplante de microbiota fecal

Kang *et al.* (2017) realizou um ensaio clínico aberto com 18 crianças e adolescentes autistas com problemas gastrointestinais moderados a graves. O tratamento foi um transplante de microbiota fecal a longo-prazo, denominado pelo grupo como Terapia de Transferência de Microbiota (TTM), e envolveu uma dose inicial elevada seguida por doses de manutenção durante 7-8 semanas.

Na avaliação dos sintomas GI, pelo questionário GSRS (*Gastrointestinal Symptom Rating Scale* – Escala de Avaliação de Sintomas Gastrointestinais), constatou-se melhora significativa ($p < 0,001$) para dor abdominal, indigestão, diarreia e constipação. A pontuação média do GSRS teve uma queda de 82% do início ao fim do tratamento, e permaneceu melhorada mesmo após 8 semanas do término da intervenção (diminuição de 77% em relação à linha de base) ($p < 0,001$).

Além disso, pela avaliação dos registros diários de fezes, observou-se queda significativa no número de dias com fezes anormais ou sem fezes ($p = 0,002$), melhorias estas mantidas depois de oito semanas sem tratamento.

Adicionalmente, avaliou-se os sintomas do TEA. O teste PGI-III (*Parent Global Impressions - III* – Impressões globais dos pais - III) revelou uma melhora que se manteve 8 semanas após o término do tratamento ($p < 0,001$). As pontuações no CARS diminuíram em 22% do início ao fim do tratamento e, após 8 semanas sem tratamento, 24% em relação à linha de base ($p < 0,001$). E a pontuação de VABS-II (*Vineland Adaptive Behavior Scale - II* – Escala de comportamento adaptativo de Vineland - II) indicou um aumento na idade média de desenvolvimento em 1,4 anos ($p < 0,001$) em todas as áreas de subdomínio durante a TTM.

O trabalho de KANG *et al.* (2017) apresentou uma correlação negativa significativa entre a mudança no GSRS e no PGI-III ($R = -0,59$; $p < 0,001$), indicando que a piora nos sintomas GI tem relação direta com os comportamentos do TEA.

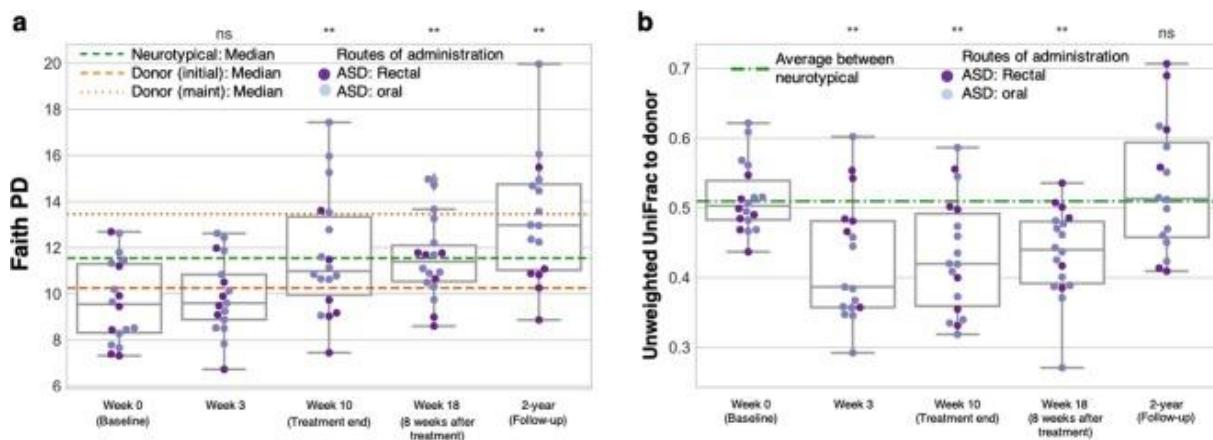
Acerca da microbiota intestinal, Kang *et al.* (2017) analisou a diversidade bacteriana e de fagos em amostras de fezes ao longo do tempo, bem como correlações com os dados clínicos. Foi observado um aumento na diversidade bacteriana dos participantes com TEA ao final do tratamento, permanecendo maior que a linha de base oito semanas depois. A riqueza mediana na última semana avaliada pelo estudo (18º semana) foi estatisticamente indistinguível ($p = 0,78$) entre o grupo TEA e o grupo controle (crianças neurotípicas) (Figura 7a). Ademais, após o tratamento, os receptores da TTM eram mais semelhantes aos doadores do que a variação interpessoal normal, ressaltando que a comunidade bacteriana do doador foi pelo menos parcialmente incorporada ao intestino do receptor. (Figura 9b). Por fim, mudanças significativas foram observadas na abundância relativa de gêneros bacterianos específicos, como *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Desulfovibrio* ($p = 0,01$; $0,02$ e $0,005$, respectivamente).

Subsequentemente, o artigo de Kang *et al.* (2019) traz os resultados de um acompanhamento de dois anos após a TTM, contando com todos os participantes originais do grupo de intervenção. As mesmas avaliações para os sintomas GI e de

TEA foram repetidos, sendo relatado pela maioria dos participantes que os sintomas GI permaneceram melhorados em comparação com a linha de base, enquanto que os sintomas de TEA melhoraram lenta e constantemente desde a 18^o semana do ensaio clínico. Como exemplo, tem-se que a gravidade do TEA, de acordo com o teste CARS, no acompanhamento foi 47% menor do que a linha de base, ao passo que ao término da intervenção era 23% menor.

Novamente, amostras de fezes foram coletadas, e a maioria dos participantes mantiveram uma maior diversidade da microbiota intestinal em relação à linha de base, sendo em muitos casos uma diversidade ainda maior do que a observada na 18^o semana do ensaio clínico (Figura 7a). Já a comparação com a microbiota de doadores, medida pela distância UniFrac não ponderada dentre outras métricas, mostrou que não haviam mais semelhanças como antes (Figura 7b), indicando que os receptores da TTM não retiveram completamente o microbioma transferido.

Figura 7 – Mudanças na microbiota fecal ao longo da terapia de transferência de microbiota e após dois anos



a. Mudanças na diversidade filogenética de Faith do grupo TEA. Linhas laranjas = mediana do desvio padrão das amostras dos doadores (linha tracejada = amostras iniciais (n = 5); linha pontilhada = amostras de dose de manutenção (n = 2)); linha verde = mediana do desvio padrão das amostras dos 20 controles neurotípicos na semana zero. **b.** Distâncias UniFrac não ponderadas entre a microbiota intestinal do grupo TEA e a amostra do doador mais relevante (amostra inicial do doador nas semanas 0 e 3, amostra de dose de manutenção mais recente nas semanas 10 e 18). Linha verde = variação interpessoal mediana entre controles neurotípicos.

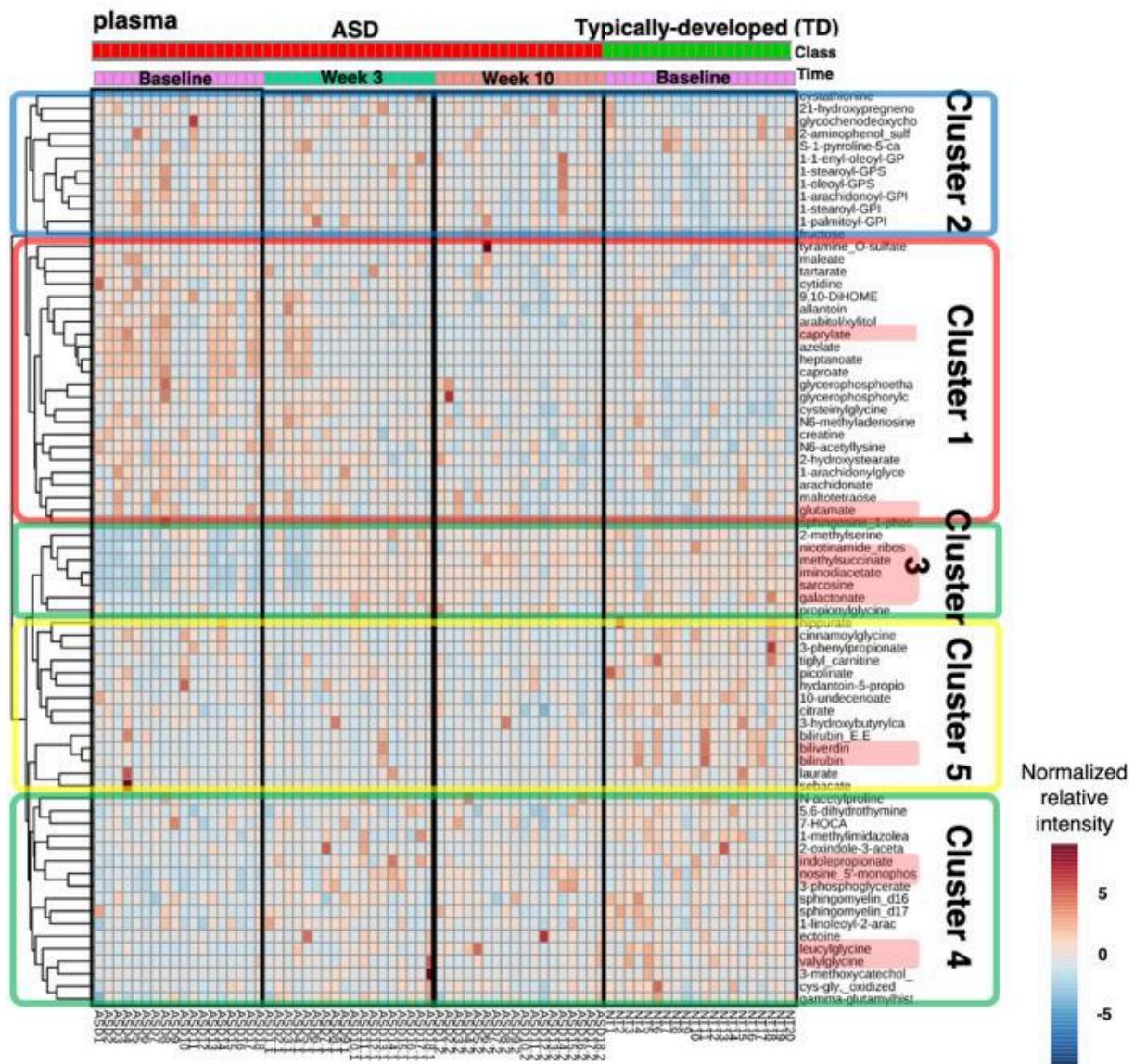
ns = não significativo; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Imagen de Kang *et al.*, 2019.

De forma complementar, o artigo de Kang *et al.* (2020) traz perfis metabólicos abrangentes de amostras plasmáticas e fecais. Desse modo, tem-se que na linha de base do estudo, em 2017, os níveis plasmáticos de dois metabólitos - caprilato e heptanoato - eram significativamente mais altos no grupo TEA do que no grupo neurotípico, enquanto ribosídeo de nicotinamida, monofosfato de inosina, iminodiacetato, metilsuccinato, galactonato, valilglicina, sarcosina e leucilglicina foram significativamente mais baixos quando comparados. O tratamento de transferência de microbioma trouxe mudanças globais para os perfis plasmáticos (Figura 8). Nos testes de correlação realizados pelos autores, observou-se que o metilsuccinato, cujos níveis haviam aumentado para níveis normais após a TTM, estava fortemente correlacionado de maneira positiva com o teste PGI-R ($r = 0,75$) e correlacionado de maneira negativa com o teste GSRS ($r = -0,51$), consistente com as melhorias nos sintomas de TEA e GI após a terapia.

Por outro lado, os metabólitos fecais dos grupos TEA e neurotípico foram semelhantes no início do estudo e permaneceram semelhantes após a TTM.

Figura 8 – Perfil de mapa de calor com dendrograma com amostras de plasma em diferentes pontos do tempo



Os metabólitos plasmáticos foram agrupados nos grupos 1 e 2 se seus níveis iniciais na linha de base eram maiores, ou nos grupos 3, 4 e 5, se eram menores. Após a terapia de transferência de microbiota, os grupos 1, 3 e 4 diminuíram seus níveis, com metabólitos que se tornaram mais semelhantes aos níveis de amostras do grupo neurotípico, enquanto os grupos 2 e 5 mantiveram seus níveis, sem mudanças significativas. KANG *et al.*, 2020.

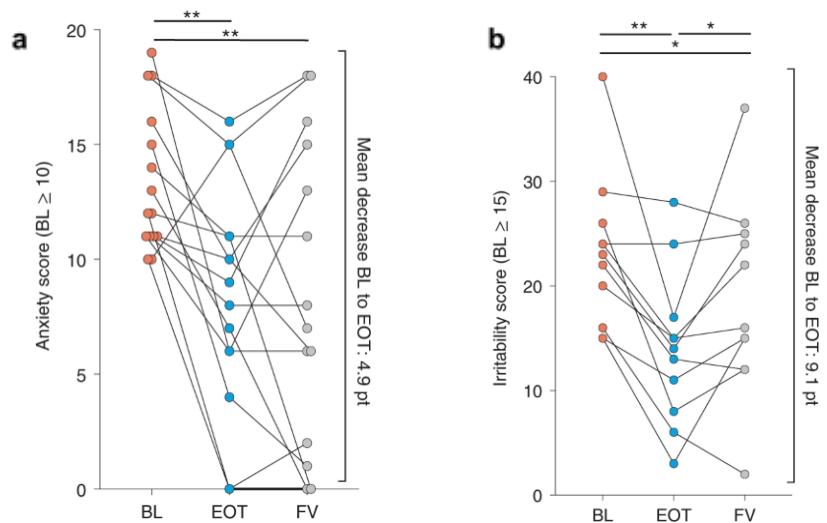
4.6. Molécula sintética

Stewart Campbell *et al.* (2022) conduziu um ensaio clínico aberto, de coorte única com 24 adolescentes autistas com sintomas GI, utilizando um adsorvente de carbono esférico de alta área superficial (AB-2004), o qual possui afinidade por pequenas moléculas aromáticas ou fenólicas e não é absorvido pelo trato GI.

Ao final do tratamento, 76,9% dos participantes melhoraram pelo menos um ponto na escala CGI-I. Também houve um aumento médio de 7,8 pontos no teste ABC (limite mínimo clinicamente relevante = 3,75 pontos). Os participantes com alta ansiedade na linha de base apresentaram melhorias significativas ($p_{ajustado} \leq 0,01$) que persistiram um mês após a intervenção (Figura 9a). No entanto, aqueles com alta irritabilidade tiveram melhorias significativas ($p_{ajustado} \leq 0,01$) que foram revertidas ou diminuídas após a interrupção do AB-2004 (Figura 9b).

Além disso, as concentrações de diversos metabólitos na urina e no plasma mostraram alta correlação, e os níveis urinários voltaram ao normal quatro semanas após o tratamento.

Figura 9 – Melhora na ansiedade e na irritabilidade em indivíduos com altas pontuações iniciais, após a administração do AB-2004



a. Pontuações de ansiedade PARS ao longo do estudo do subconjunto de participantes com pontuação ≥ 10 no início ($n = 15$). b. Pontuações de irritabilidade (ABC-I) ao longo do estudo do subconjunto de participantes com pontuação ≥ 15 no BL ($n = 11$). * p ajustado $\leq 0,05$; ** p ajustado $\leq 0,01$; NS = não significativo; pt = pontos; BL = baseline; EOT = end of treatment; FV = follow-up safety evaluation. Gráficos retirados de imagem de STEWART CAMPBELL *et al.*, 2022.

5. DISCUSSÃO

Esta revisão contou com quinze artigos, que forneceram os resultados de doze estudos intervencionistas. A estratégia de pesquisa utilizada trouxe dois casos de artigos correlacionados, porém, as pesquisas de Allan *et al.* (2024) e Raghavan *et al.* (2023) também são continuações de outros estudos, os quais não foram abrangidos pela busca. Isso aponta uma limitação do método, uma vez que outros estudos relevantes para o tema podem ter sido excluídos em razão do sistema de filtros (*Query box*) adotado.

Os ensaios clínicos selecionados apresentaram diferentes desenhos de estudo, resultando em variados níveis de evidência científica. Considerando que estudos randomizados, duplo-cego e controlados por placebo possuem nível mais alto de evidência em comparação com estudos abertos (BURNS; CHUNG; ROHRICH, 2011), os resultados aqui expostos devem ser interpretados com cautela, a exemplo do ensaio clínico de Kang *et al.* (2017, 2019, 2020), cujos participantes apresentaram melhora clínica significativa tanto para os sintomas GI quanto para sintomas do TEA, mesmo após dois anos de realização da intervenção. Tal pesquisa contou com um desenho do estudo aberto e sem um grupo controle, tornando-o mais suscetível a vieses e diminuindo a confiabilidade dos resultados positivos observados.

Os estudos cruzados possibilitam avaliar a resposta de um único participante a dois tratamentos, eliminando assim a variação entre pacientes (SIBBALD *et al.*, 1998). No caso do TEA, que apresenta diversos fenótipos e várias comorbidades, incluindo gastrointestinais, essa abordagem se torna vantajosa. Contudo, enquanto que no estudo de Sanctuary *et al.* (2019) não encontrou-se nenhuma evidência de efeito de transferência, o estudo de Arnold *et al.* (2019) apresentou uma transferência considerável para pelo menos três semanas além da última dose de probiótico, indicando que um estudo em paralelo se faz necessário neste caso.

Duas análises principais foram investigadas pela maioria dos estudos: a avaliação de melhora sintomática por meio de diversos questionários e a análise laboratorial para constatar alterações na microbiota ou no hospedeiro. Como já mencionado, o diagnóstico de TEA é apenas clínico, logo o uso dos questionários padronizados é essencial para quantificar as mudanças ocorridas durante os

ensaios. Contudo, há testes que são realizados por profissionais clínicos e testes respondidos pelos responsáveis dos participantes. Assim, é importante o uso de ambos os tipos de questionários, como ocorre nos estudos de Kang *et al.* (2017) e Liu *et al.* (2019), para uma visão mais ampla dos resultados, e como uma forma para se evitar vieses.

Ressalta-se que as respostas placebo são amplamente evidentes em ensaios clínicos de TEA, devido à utilização de resultados subjetivos avaliados por uma terceira pessoa e à falta de marcadores objetivos (CURIE; OBERLANDER; JENSEN, 2023). Tal fenômeno, em que cuidadores ou clínicos moldam indiretamente os resultados dos pacientes é denominado placebo por procuração (CURIE; OBERLANDER; JENSEN, 2023). Por isso a importância das análises metagenômicas nos artigos aqui estudados. O estudo de Liu *et al.* (2019) não analisou nenhum parâmetro da microbiota ou parâmetro bioquímico dos participantes, o que enfraquece a associação das melhorias comportamentais observadas à ação do probiótico na microbiota.

Outro fator que dificulta a mensuração dos benefícios obtidos pelas intervenções é o número de participantes que deixam as pesquisas, o que afeta as análises estatísticas comparando o início e o fim das intervenções, assim como compromete a proporção entre os braços dos estudos e afeta a significância do tratamento. Dentre os motivos, estão a alta taxa de abandono, dificuldade para coleta dos exames, bem como a necessidade de entrar com outros tratamentos, como antibióticos, resultando na exclusão do participante do estudo. Não obstante, alguns artigos descreveram artifícios utilizados para verificar o grau de adesão. Por exemplo, Sanctuary *et al.* (2019) realizou um acompanhamento do bem-estar dos pacientes via telefonema, enquanto Arnold *et al.* (2019) contabilizou o número de recipientes de probióticos ou placebo devolvidos.

Ainda sobre possíveis interferências nos resultados, tem-se um quadro muito divergente do direcionamento dado pelos pesquisadores sobre a dieta dos participantes e os tratamentos concomitantes. Para ilustrar, no estudo de Wang *et al.* (2020), as crianças autistas receberam os suplementos sob “condições rigorosas de alimentação estritamente unificada”, sendo que um dos critérios de exclusão do ensaio era o uso de medicamentos psicotrópicos, ao passo que, no caso de

Hrnciarova *et al.* (2024), a inclusão das crianças no estudo não afetou seus tratamentos, educação ou reabilitação existentes, e também não houve nenhum acompanhamento das dietas seguidas pelos participantes. Ambos os estudos são duplo-cego e controlados por placebo, mas com delineamentos totalmente diferentes.

Mais um aspecto a ser refletido é a duração dos tratamentos e dos acompanhamentos. Na pesquisa de Wang *et al.* (2020), algumas melhorias nos parâmetros de comportamento avaliados (Tabela 5), só apresentaram significância estatística a partir de 60 dias de tratamento probiótico, o que equivale a aproximadamente 8,5 semanas. Enquanto isso, Sanctuary *et al.* (2019) e Liu *et al.* (2019) realizaram intervenções probióticas por apenas 5 e 4 semanas, respectivamente, sugerindo que um tratamento de maior duração poderia providenciar mais benefícios aos pacientes. Já a pesquisa de Stewart Campbell *et al.* (2022), por realizar um acompanhamento pós término do tratamento, pôde observar, por exemplo, que a melhora promovida nos parâmetros de ansiedade persistiu um mês após a retirada da intervenção, enquanto que para os parâmetros de irritabilidade, houve reversão ou diminuição da melhora nesse período - evidenciando a importância da análise posterior para verificar efeitos de longa duração.

Por outro lado, há a pesquisa de PÄRTTY *et al.* (2015) com o maior tempo de acompanhamento após a intervenção: treze anos. Todavia, o desenho deste estudo difere dos demais por não aplicar a intervenção em participantes já diagnosticados com TEA - avalia-se o índice de diagnóstico após a intervenção probiótica. Sabendo-se que o TEA é multicausal e com fatores de risco genéticos (LORD *et al.*, 2018), pode-se considerar o uso de probiótico como uma modulação terapêutica nesse caso, e por isso, incluiu-se o estudo na revisão.

Sobre a análise da composição da microbiota intestinal, percebe-se que em alguns não foi possível observar nenhuma diferença significativa na diversidade alfa após o tratamento, como no caso de Sanctuary *et al.* (2019), Arnold *et al.* (2019) e Raghavan *et al.* (2024). Porém, tal constatação deve ser vista com cautela, uma vez que há camadas de alterações nesse ecossistemas que podem passar despercebidas a depender da análise realizada. Um exemplo disso é o estudo de

Kong *et al.* (2020) no qual as medidas de diversidade alfa e beta não apresentaram mudanças significativas, mas ao analisar as interações entre os microrganismos, observou-se sim mudanças significativas no microbioma.

Ademais, as análises de correlação realizadas em Kang *et al.* (2017), Arnold *et al.* (2019), Kang *et al.* (2020) e Hrnciarova *et al.* (2024) contribuem para reforçar os resultados sintomáticos, metabólicos e microbianos observados nos estudos. Ainda que não indiquem causalidade, ajudam na construção de hipóteses mecanísticas para a atuação do microbioma no TEA.

6. CONCLUSÃO

Por meio desta revisão bibliográfica, pode-se verificar que ainda há um longo percurso a ser percorrido para a determinação de um tratamento via modulação da microbiota intestinal para o TEA. Ainda assim, houve resultados significativos alcançados, principalmente em intervenções probióticas e de suplementação, e no caso do transplante de microbiota fecal. Portanto, o próximo passo é o investimento em mais estudos duplo-cego, randomizados e controlados por placebo, com tratamento de longa duração e acompanhamento posterior. Os ensaios devem não apenas buscar por um maior tamanho amostral, mas também ter estratégias para maior adesão dos participantes. A análise dos sintomas relativos ao TEA deve envolver questionários para profissionais clínicos e para pais/responsáveis, enquanto que para o estudo da microbiota, deve-se investir cada vez mais em análises sofisticadas, a fim de verificar as alterações sutis nesse ecossistema capazes de influenciar a relação intestino-cérebro.

7. REFERÊNCIAS

- ALAMOUDI, M. U. *et al.* Comparing the Gut Microbiome in Autism and Preclinical Models: A Systematic Review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 1 jul. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9286068/>. Acesso em: 3 ago. 2024.
- ALLABAND, C. *et al.* Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 218–230, jan. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6391518/>. Acesso em: 6 out. 2024.
- ALLAN, N. P. *et al.* Ketogenic Diet Induced Shifts in the Gut Microbiome Associate with Changes to Inflammatory Cytokines and Brain-Related miRNAs in Children with Autism Spectrum Disorder. **Nutrients**, v. 16, n. 10, p. 1401, 7 maio 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11124410/>. Acesso em: 26 set. 2024.
- ARNOLD, L. E. *et al.* Probiotics for Gastrointestinal Symptoms and Quality of Life in Autism: A Placebo-Controlled Pilot Trial. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**, v. 29, n. 9, p. 659–669, 1 nov. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7364307/>. Acesso em: 5 ago. 2024.
- BÄCKHED, F. *et al.* Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 5, p. 611–622, nov. 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6351938/>. Acesso em: 6 out. 2024.
- BURNS, P.; CHUNG, K.; ROHRICH, R. The Levels of Evidence and Their Role in evidence-based Medicine. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 128, n. 1, p. 305–310, 1 jul. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3124652/>. Acesso em: 4 out. 2024.
- CHERNIKOVA, M. A. *et al.* The Brain-Gut-Microbiome System: Pathways and Implications for Autism Spectrum Disorder. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4497, 16 dez. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8704412/>. Acesso em: 4 ago. 2024.
- CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. **Chapter 12 - Environmental Biotechnology**. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123850157000120>. Acesso em: 6 out. 2024.
- CLINICALTRIALS.GOV. **ClinicalTrials.gov: banco de dados de ensaios clínicos**. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/>. Acesso em: 5 out. 2024.
- CRYAN, J. F. *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 1 out. 2019. Disponível em:

<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00018.2018>. Acesso em: 20 ago. 2023.

CURIE, A.; OBERLANDER, T. F.; JENSEN, K. B. Placebo effects in children with autism spectrum disorder. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 14 mar. 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dmcn.15574>. Acesso em: 1 out. 2024.

GREEN, E. Shotgun Sequencing. 2020. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Shotgun-Sequencing>. Acesso em: 6 out. 2024.

GRIMALDI, R. *et al.* A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 1 ago. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6091020/>. Acesso em: 2 ago. 2024.

HAO, Y.; PEI, Z.; BROWN, S. M. Bioinformatics in Microbiome Analysis. **Methods in Microbiology**, p. 1–18, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0580951717300028>. Acesso em: 6 out. 2024.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–14, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>. Acesso em: 1 jul. 2024.

HIROTA, T.; KING, B. H. Autism Spectrum Disorder: A Review. **JAMA**, v. 329, n. 2, p. 157–168, 10 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2022.23661>. Acesso em: 29 jan. 2024.

HRNCIAROVA, J. *et al.* Modulation of Gut Microbiome and Autism Symptoms of ASD Children Supplemented with Biological Response Modifier: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Pilot Study. **Nutrients**, v. 16, n. 13, p. 1988, 1 jan. 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/16/13/1988>. Acesso em: 29 set. 2024.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29411548/>. Acesso em: 3 ago. 2024.

HUGHES, H. K.; ROSE, D.; ASHWOOD, P. The Gut Microbiota and Dysbiosis in Autism Spectrum Disorders. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 18, n. 11, 24 set. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30251184/>. Acesso em: 3 ago. 2024.

JUREK, B.; NEUMANN, I. D. The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1805–1908, 1 jul. 2018. Disponível em: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29897293/>. Acesso em: 6 ago. 2024.

KANG, D.W. *et al.* Distinct Fecal and Plasma Metabolites in Children with Autism Spectrum Disorders and Their Modulation after Microbiota Transfer Therapy. **mSphere**, v. 5, n. 5, 28 out. 2020. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7580952/>. Acesso em: 7 set. 2024.

KANG, D.W. *et al.* Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 9 abr. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6456593/>. Acesso em: 7 set. 2024.

KANG, D.W. *et al.* Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. **Microbiome**, v. 5, n. 1, 23 jan. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5264285/>. Acesso em: 7 set. 2024.

KHO, Z. Y.; LAL, S. K. The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 9, 14 ago. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.01835/full>. Acesso em 6 out. 2024.

KONG, X.J. *et al.* Probiotic and Oxytocin Combination Therapy in Patients with Autism Spectrum Disorder: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Pilot Trial. **Nutrients**, v. 13, n. 5, p. 1552, 5 maio 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8147925/>. Acesso em: 6 ago. 2024.

LAI, M.C. *et al.* Subgrouping the Autism “Spectrum”: Reflections on DSM-5. **PLoS Biology**, v. 11, n. 4, p. e1001544, 23 abr. 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1001544>. Acesso em: 1 jul. 2024.

LEE, R. W. Y. *et al.* A modified ketogenic gluten-free diet with MCT improves behavior in children with autism spectrum disorder. **Physiology & Behavior**, v. 188, p. 205–211, maio 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5863039/>. Acesso em: 26 set. 2024.

LIU, Y.W. *et al.* Effects of Lactobacillus plantarum PS128 on Children with Autism Spectrum Disorder in Taiwan: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 820, 11 abr. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6326569/>. Acesso em: 4 ago. 2024.

LORD, C. *et al.* Autism spectrum disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1–23, 16 jan. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0138-4>. Acesso em: 21 ago. 2023.

LORD, C. *et al.* Autism Spectrum Disorder. **The Lancet**, v. 392, n. 10146, p. 508–520, ago. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673618311292>. Acesso em: 21 ago. 2023.

MADRA, M.; RINGEL, R.; MARGOLIS, K. G. Gastrointestinal Issues and Autism

Spectrum Disorder. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 29, n. 3, p. 501–513, jul. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8608248/>. Acesso em: 27 ago. 2023.

MAYER, E. A. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 453–466, 13 jul. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3845678/>. Acesso em: 29 jan. 2024.

MAYER, E. A.; NANCE, K.; CHEN, S. The Gut–Brain Axis. **Annual Review of Medicine**, v. 73, n. 1, p. 439–453, 27 jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042320-014032>. Acesso em: 29 jan. 2024.

MCELHANON, B. O. *et al.* Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. **PEDIATRICS**, v. 133, n. 5, p. 872–883, 28 abr. 2014. Disponível em: <https://publications.aap.org/pediatrics/article-abstract/133/5/872/81578/Gastrointestinal-Symptoms-in-Autism-Spectrum?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 28 ago. 2023.

MOHER, D. *et al.* Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: the PRISMA Statement. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 7, 21 jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>. Acesso em: 15 ago. 2023.

NEEDHAM, B. D.; TANG, W.; WU, W.-L. Searching for the gut microbial contributing factors to social behavior in rodent models of autism spectrum disorder. **Developmental Neurobiology**, v. 78, n. 5, p. 474–499, 20 fev. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29411548/>. Acesso em: 3 ago. 2024.

PARK, C. C. **A dictionary of environment and conservation**. 1. ed. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2007.

PÄRTTY, A. *et al.* A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. **Pediatric Research**, v. 77, n. 6, p. 823–828, 11 mar. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/pr201551>. Acesso em: 1 ago. 2024.

RAGHAVAN, K. *et al.* Benefits of Gut Microbiota Reconstitution by Beta 1,3–1,6 Glucans in Subjects with Autism Spectrum Disorder and Other Neurodegenerative Diseases. **Journal of Alzheimer's Disease**, p. 1–12, 6 set. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10473118/>. Acesso em: 28 set. 2024

RAGHAVAN, K. *et al.* Improvement of behavioural pattern and alpha-synuclein levels in autism spectrum disorder after consumption of a beta-glucan food supplement in a randomised, parallel-group pilot clinical study. **BMJ Neurology Open**, v. 4, n. 1, p. e000203, 18 jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35128402/>. Acesso em: 28 set. 2024.

RAGHAVAN, K. *et al.* Improvement of sleep and melatonin in children with autism

spectrum disorder after β -1,3/1,6-glucan consumption: An open-label prospective pilot clinical study. **Brain and Behavior**, v. 12, n. 9, 22 ago. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35993920/>. Acesso em: 28 set. 2024.

SANCTUARY, M. R. *et al.* Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0210064, 9 jan. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6326569/>. Acesso em: 3 ago. 2024.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLOS Biology**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 19 ago. 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article%3Fid%3D10.1371/journal.pbio.1002533>. Acesso em: 6 out. 2024.

SHARON, G. *et al.* Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. **Cell**, v. 177, n. 6, p. 1600-1618.e17, maio 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6993574/>. Acesso em: 1 jul. 2024.

SHERMAN, H. T. *et al.* Carbon monoxide (CO) correlates with symptom severity, autoimmunity, and responses to probiotics treatment in a cohort of children with autism spectrum disorder (ASD): a post-hoc analysis of a randomized controlled trial. **BMC Psychiatry**, v. 22, p. 536, 8 ago. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9358122/>. Acesso em: 27 set. 2024.

SIBBALD, B.; ROBERTS, C. Understanding controlled trials Crossover trials. **BMJ: British Medical Journal**, v. 316, n. 7146, p. 1719–1720, 6 jun. 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1113275/>. Acesso em: 1 out. 2024.

STEWART CAMPBELL, A. *et al.* Safety and target engagement of an oral small-molecule sequestrant in adolescents with autism spectrum disorder: an open-label phase 1b/2a trial. **Nature Medicine**, p. 1–7, 14 fev. 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-022-01683-9>. Acesso em: 30 set. 2024.

WANG, Y. *et al.* Probiotics and fructo-oligosaccharide intervention modulate the microbiota-gut brain axis to improve autism spectrum reducing also the hyper-serotonergic state and the dopamine metabolism disorder. **Pharmacological Research**, v. 157, p. 104784, jul. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661819326568>. Acesso em: 5 jul. 2024.

ZEIDAN, J. *et al.* Global prevalence of autism: A systematic review update. **Autism Research**, v. 15, n. 5, p. 778–790, 3 mar. 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/aur.2696>. Acesso em: 21 ago. 2023.



Julia Diziró de Sant'Anna

17/10/2024

Data e assinatura do aluno(a)



Christian Hoffmann

17/10/2024

Data e assinatura do orientador(a)