

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

Identificação da relação entre o transtorno de espectro de autismo (TEA) e a microbiota intestinal alterada e como o transplante fecal pode ser utilizado como forma de tratamento da doença.

Maurício Callegari Lordello

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

Orientador(a):

Prof.(a). Dr(a) Thomas Prates Ong

São Paulo

2021

SUMÁRIO

SUMÁRIO	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMO.....	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS	8
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
4.1 PATOGÊNESE E SINTOMAS DO TEA.....	9
4.2 PROBLEMAS GASTROINTESTINAIS EM PACIENTES COM TEA	10
4.3 PERMEABILIDADE INTESTINAL.....	11
4.4 MICROBIOTA.....	12
4.5 EIXO INTESTINO-CÉREBRO	17
4.5.1 ÁCIDO PROPIONICO	18
4.5.2 GABA	18
4.5.3 LIPOPOLISSACARÍDEOS	19
4.5.4 NEUROTOXINAS	19
4.5.5 TEORIA DO EXCESSO DE OPIÓIDES	19
4.6 TRATAMENTOS.....	20
4.6.1 DIETA <i>GLUTEN-FREE CASEIN-FREE</i>	21
4.6.2 PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS	22
4.6.3 TRANSPLANTE FECAL/MICROBIOTA.....	24
5 CONCLUSÃO	27
6 BIBLIOGRAFIA	29

LISTA DE ABREVIATURAS

TEA	Transtorno de Espectro de Autismo
GI	Gastrointestinal
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
OMS	Organização Mundial da Saúde
LPS	Lipopolissacarídeos
PPA	Ácido Propiônico
IL	Interleucina
GABA	Ácido Gama-aminobutírico

RESUMO

LORDELLO, MC. **Identificação da relação entre o transtorno de espectro de autismo (TEA) e a microbiota intestinal alterada e como o transplante fecal pode ser utilizado como forma de tratamento da doença.** 2021. no. 1173-21. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Palavras-chave: Transtorno de Espectro de Autismo, Microbiota Intestinal, Transplante Fecal/Microbiota.

INTRODUÇÃO: O transtorno do espectro do autismo (TEA), popularmente conhecido como apenas autismo, é um transtorno complexo caracterizado pela deficiência de desenvolvimento que pode causar desafios sociais, de comunicação e comportamentais. Muitos estudos relatam microbiota intestinal anormal em indivíduos com TEA, sugerindo uma relação entre eles, principalmente quando há uma proliferação exagerada de bactérias do gênero *Clostridium*. Modificar e reequilibrar a microbiota intestinal seria um caminho interessante para melhorar os sintomas gastrointestinais e comportamentais em indivíduos com TEA, e o transplante fecal/microbiota pode transformar a microbiota intestinal disbiótica (microbiota intestinal alterada) em uma microbiota saudável. Esse método de modificação poderá ser um dos tratamentos para o autismo no futuro, melhorando a qualidade da vida de milhares de pacientes. **OBJETIVO:** Tendo por base a literatura científica existente, o objetivo primário deste trabalho é discutir a relação entre a microbiota intestinal e o transtorno do espectro do autista (TEA), seja na causa ou nos sintomas da doença. Uma vez discutida essa relação, o objetivo secundário é discutir possíveis soluções terapêuticas relacionadas ao reequilíbrio da microbiota intestinal que causariam um impacto positivo em um indivíduo com TEA, como o transplante fecal/microbiota. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi realizada uma revisão e análise dos principais artigos científicos nacionais e internacionais presentes na literatura publicados nos últimos 15 anos. As bases de dados que

foram utilizadas para essa revisão são: PubMed, SciFinder, Web of Science, SciELO e outras que venham a apresentar dados relevantes sobre a relação entre a microbiota intestinal e o autismo. Os descritores utilizados para a pesquisa foram: “Autism”, “Intestinal Bacterial Flora”, “Autism and Intestinal Bacterial Flora”, “Gut Microbiota”, “Autism and Gut Microbiota”, “Fecal Transplant”, “Microbiota Transplant” e os mesmos descritores na língua portuguesa. RESULTADOS: O TEA é uma doença de neurodesenvolvimento diversificada e complicada que integra mecanismos genéticos, epigenéticos e ambientais para formar um fenótipo complexo. Das muitas comorbidades médicas associadas ao TEA, o desconforto gastrointestinal ganhou atenção significativa por causa de sua prevalência relatada e pois os sintomas gastrointestinais parecem se correlacionar fortemente com a gravidade de seu TEA. Indivíduos com TEA apresentam uma microbiota intestinal desequilibrada e diferente de indivíduos saudáveis, principalmente pela alta quantidade de bactérias do gênero *Clostridium* presente. A disbiose aumenta permeabilidade intestinal, principalmente pela indução da zonulina, e permite que certas endotoxinas atravessem as células epiteliais do intestino e cheguem ao cérebro, onde geram inflamação e, conseqüentemente, os sintomas neurocomportamentais do TEA. Portanto, acredita-se haver uma relação direta entre a disbiose e alguns sintomas no autismo. O uso de pro e prebióticos e principalmente do transplante fecal/microbiota estão sendo bastante estudados e utilizados em indivíduos com TEA com o objetivo de reequilibrar a microbiota intestinal e diminuir a permeabilidade intestinal. Estes tratamentos vêm gerando resultados positivos na diminuição dos sintomas gastrointestinais e neurocomportamentais de pacientes com TEA. CONCLUSÃO: Embora os resultados desses tratamentos sejam positivos e possam ser utilizados como formas inéditas de tratamento para um subgrupo de pacientes com TEA em breve, ensaios clínicos bem planejados, duplo-cegos, randomizados e controlados por placebo são necessários para validar a sua eficácia e para identificar as cepas, a dose e o tempo de tratamento apropriados.

1 INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro do autismo (TEA), popularmente conhecido como apenas autismo, é um transtorno complexo caracterizado pela deficiência de desenvolvimento que pode causar desafios sociais, de comunicação e comportamentais¹.

O autismo difere de pessoa para pessoa na gravidade e na combinação dos sintomas, por isso, o uso do termo espectro. Há uma grande variedade de habilidades e características das pessoas com transtorno do espectro do autismo, portanto nenhuma pessoa se comporta da mesma maneira².

O diagnóstico e o tratamento precoces são importantes para reduzir os sintomas do autismo e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Porém, diagnosticar o TEA pode ser difícil, pois ainda não existe nenhum teste médico, como um exame de sangue, para diagnosticar este transtorno. O diagnóstico é feito a partir da observação de como a criança fala e age em relação a outras crianças da mesma idade. Profissionais treinados geralmente diagnosticam o autismo conversando com a criança e fazendo perguntas aos pais e outros cuidadores³. Alguns comportamentos típicos indicam uma alta chance de uma criança sofrer desse transtorno, como por exemplo: ter dificuldades em continuar uma conversação, evitar contato visual e expressões faciais e querer ficar sozinho, ter problemas para se relacionar com os outros ou não ter nenhum interesse em outras pessoas, não apontar para objetos para mostrar interesse ou não olhar para objetos quando outra pessoa aponta para eles, entre outros².

Infelizmente, o TEA ainda não parece ter uma causa principal. Vários fatores, provavelmente, contribuem para o autismo, incluindo genes com os quais uma criança nasce ou fatores ambientais³.

Uma vez que o diagnóstico de TEA é realizado, os déficits são tratados com uma abordagem de equipe multidisciplinar. A abordagem do tratamento normalmente inclui terapias ocupacionais, comportamentais e muitas vezes nutricionais. Ainda não há tratamentos farmacológicos para TEA, embora muitos indivíduos recebam medicamentos para tratar comorbidades, como convulsões e

transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Visto que o TEA engloba diferentes sintomas e características em cada indivíduo, o objetivo é personalizar o tratamento do TEA de acordo com necessidades individuais, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do paciente e daqueles ao seu redor.

Nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças do governo (CDC) estima a prevalência de autismo em 1 a cada 54 crianças (aproximadamente 1,85%)⁴. O número de meninos é quatro vezes maior que o de meninas⁵. A ONU, através da Organização Mundial da Saúde (OMS), considera a estimativa de que aproximadamente 1% da população mundial esteja dentro do espectro do autismo, a maioria sem diagnóstico ainda⁶. Considerando que atualmente a população mundial seja de, aproximadamente, 7,7 bilhões de pessoas, 1% representaria 77 milhões de pessoas, um número expressivo.

As razões para o aumento da prevalência de TEA no mundo ainda não estão claras, mas podem ser em parte devido a uma maior conscientização e reconhecimento da condição, bem como mudanças na prática diagnóstica e disponibilidade de serviços¹⁰. No entanto, alguns fatores ambientais e mudanças no estilo de vida provavelmente estão relacionados com essa “epidemia”¹¹.

Em um ponto de vista econômico, o impacto do TEA é substancial, incluindo gastos médicos e não médicos e custos diretos e indiretos de produtividade. O custo aproximado para cuidar de um indivíduo de TEA ao longo da vida é de, aproximadamente, \$ 2,2 milhões nos EUA e £ 1,5 milhões no Reino Unido. Além disso, se não for reconhecido ou tratado, o TEA pode contribuir para um baixo nível de escolaridade e dificuldade de emprego, levando a implicações econômicas negativas. Um estudo americano de 2015 estima que o impacto econômico total do TEA, com base nos custos médicos diretos, não médicos e de produtividade combinados, totalizou US \$ 268 bilhões - variando de 0,9% para 2% do produto interno bruto (PIB) dos Estados Unidos. Espera-se que esse montante aumente para US \$ 461 bilhões (variando de 0,9,9% a 3,6% do PIB) até 2025¹².

Mesmo que a causa exata do TEA ainda não seja amplamente compreendida, muitas pesquisas vêm sendo realizadas nos últimos anos gerando resultados e hipóteses que podem ajudar a desmistificar esse transtorno. Nas

últimas décadas, pesquisas apontaram para a interação entre a microbiota intestinal e o cérebro em pacientes com autismo ou outras doenças neurológicas. Um número considerável de indivíduos com TEA tem problemas gastrointestinais significativas que acompanham suas alterações neurológicas. Os sintomas gastrointestinais de indivíduos com TEA parecem correlacionar-se fortemente com a gravidade de seu TEA e seus comportamentos sociais⁷.

O intestino humano é habitado por vários trilhões de microrganismos que vivem em uma relação simbiótica com o ser humano. A microbiota está diretamente relacionada com a saúde do indivíduo. As alterações na microbiota intestinal resultam em um aumento de bactérias patogênicas que desregula a homeostase microbiana do hospedeiro. Este desequilíbrio microbiano é conhecido como disbiose e tem sido amplamente relatado como um dos principais contribuintes para a desregulação de múltiplos sistemas observados na patogênese de condições metabólicas cardiovasculares, neuroimunes e neurocomportamentais⁸.

Estudos recentes sugerem que a disbiose em indivíduos com TEA pode contribuir para os sintomas gastrointestinais e do sistema nervoso central. Assim, a pesquisa tem se concentrado nas mudanças na microbiota intestinal como um fator de risco em indivíduos que são geneticamente predispostos ao TEA; acredita-se que essas mudanças na microbiota intestinal influenciem o risco de TEA, influenciando o sistema imunológico e o metabolismo. Nos estudos que demonstram uma possível relação entre a disbiose e o autismo, nota-se uma discussão sobre a proliferação excessiva de alguns tipos de bactérias, sendo a principal dela a de gênero *Clostridium*. Um grande sinal de que esse gênero de bactéria poderia estar relacionado com o autismo foi quando perceberam que o uso de vancomicina, um antibiótico que é pouco absorvido pelo sistema gastrointestinal e efetivo para o tratamento de infecção por *Clostridium*, melhorou consideravelmente os problemas gastrointestinais do indivíduo com TEA, assim como seu comportamento social. Porém, após a retirada da vancomicina, o indivíduo voltou a ter os mesmos problemas e sintomas⁹.

Desde então vem se criando uma importância enorme em desenvolver métodos para melhorar a qualidade e equilibrar a microbiota intestinal de pessoas com TEA de forma sólida e, o mais importante, duradoura. Alguns estudos, por exemplo, demonstram o possível sucesso do método de transplante fecal/microbiota para essa população.

Entender como a microbiota se relaciona com o autismo e quais os possíveis métodos para restaurar o equilíbrio da microbiota intestinal ajudariam cerca de 1% da população mundial com TEA a ter uma qualidade de vida superior à atual e diminuir os custos relacionados públicos e privados relacionados a este transtorno.

2 OBJETIVOS

O objetivo primário deste trabalho é discutir e identificar a relação entre a microbiota intestinal e o transtorno do espectro do autista (TEA), seja na causa ou nos sintomas da doença. Uma vez discutida essa relação, o objetivo secundário é discutir possíveis soluções terapêuticas relacionadas ao reequilíbrio da microbiota intestinal que causariam um impacto positivo em um indivíduo com TEA, como o transplante fecal/microbiota.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão e análise dos principais artigos científicos nacionais e internacionais presentes na literatura publicados nos últimos 15 anos. As bases de dados que foram utilizadas para essa revisão são: PubMed, SciFinder, Web of Science, SciELO e outras que venham a apresentar dados relevantes sobre a relação entre a microbiota intestinal e o autismo. Os descritores utilizados para a pesquisa foram: “Autism”, “Intestinal Bacterial Flora”, “Autism and Intestinal Bacterial Flora”, “Gut Microbiota”, “Autism and Gut Microbiota”, “Fecal Transplant”, “Microbiota Transplant” e os mesmos descritores na língua portuguesa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PATOGÊNESE E SINTOMAS DO TEA

O TEA é uma doença de neurodesenvolvimento diversificada e complicada que integra mecanismos genéticos, epigenéticos e ambientais para formar um fenótipo complexo.

O TEA é em grande parte uma doença poligênica. Sua herdabilidade estimada é de aproximadamente 80%¹³. Porém, além do fator genético, existem diversos fatores ambientais que podem provocar modificações epigenéticas, como metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas, resultando no silenciamento do gene e na transcrição afetada. Essa integração complexa resulta na interação entre os processos imunológicos e a função sináptica. As células imunológicas desempenham um papel importante na neuroinflamação. Essa integração causa a ativação do sistema imunológico e inicia uma cascata de eventos que desencadeiam o desenvolvimento do fenótipo comportamental do TEA.

Fatores de risco ambientais responsáveis pelo desenvolvimento do TEA podem ser divididos em fatores de risco pré-natais e pós-natais. A exposição pré-natal do feto em desenvolvimento a esses fatores de risco ambientais leva ao neurodesenvolvimento prejudicado, tornando-se uma das principais causas de TEA em crianças¹⁴.

Estudos indicam que distúrbios metabólicos, incluindo obesidade e diabetes durante a gestação podem predispor o risco de desenvolvimento de TEA no feto¹⁵. A ingestão adequada de nutrientes durante a gravidez também é crucial para o desenvolvimento e maturação do cérebro do feto¹⁶. A deficiência alimentar ou a ingestão de certos alimentos alérgicos em associação com fatores genéticos, bioquímicos ou reações imunológicas podem ser transmitidos da mãe para o feto e provocar alguns efeitos adversos no cérebro em desenvolvimento do feto¹⁷. Além de obesidade e diabetes, infecções e exposição a teratógenos, como drogas e poluição, estresse durante a gestação e a idade dos pais também podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de TEA no feto¹⁸. Alguns

estudos relataram níveis significativamente mais altos de metais pesados em crianças com TEA em comparação com controles pareados¹⁹.

Como mencionado anteriormente, o alto grau de herdabilidade sugere uma forte influência genética, e distúrbios genéticos como a síndrome do X Frágil têm uma forte associação com TEA e sintomas comportamentais relacionados²⁰. Além disso, simplesmente ter um cromossomo Y parece ser um dos maiores fatores de risco para um diagnóstico de TEA, pois eles ocorrem cerca de duas vezes mais em homens, quando a deficiência intelectual também está presente, e mais de 5 vezes sem deficiência intelectual²¹.

Os principais sintomas observados em pacientes com TEA são falta de interação social, comportamento generalizado, estereotipado e restrito, enquanto os sintomas associados incluem irritabilidade, ansiedade, agressão, convulsões, problemas de sono, condições metabólicas e distúrbios gastrointestinais, que têm impactos significativos na saúde, no desenvolvimento, sociais e educacionais.

4.2 PROBLEMAS GASTROINTESTINAIS EM PACIENTES COM TEA

Das muitas comorbidades médicas associadas ao TEA, o desconforto gastrointestinal ganhou atenção significativa por causa de sua prevalência relatada e pois os sintomas gastrointestinais parecem se correlacionar fortemente com a gravidade de seu TEA²².

Indivíduos com TEA são mais suscetíveis a problemas gastrointestinais, como dor abdominal crônica, reflexos peristálticos prejudicados, distúrbios da motilidade intestinal (por exemplo, constipação e fezes moles crônicas) e distensão abdominal. Em comparação com crianças com TEA, mas sem sintomas gastrointestinais, aquelas com sintomas gastrointestinais têm maior probabilidade de serem irritáveis, agitadas, socialmente retraídas, letárgicas e hiperativas²³.

Um estudo demonstrou que 70% das crianças diagnosticadas com TEA tinham problemas gastrointestinais em comparação com 42% das crianças com outros problemas de neurodesenvolvimento, como paralisia cerebral, e 28% das crianças com desenvolvimento típico²⁴.

Os motivos para essa maior susceptibilidade estão sendo constantemente estudados e parecem estar relacionados, principalmente, com o aumento da

permeabilidade intestinal. Esta permeabilidade aumentada permite que substâncias presentes no intestino e metabólitos bacterianos que são potencialmente neuro-ativos cruzem a barreira intestinal e, por meio do eixo intestino-cérebro, afetem o sistema nervoso do indivíduo²⁵.

4.3 PERMEABILIDADE INTESTINAL

Um aumento na permeabilidade intestinal foi encontrado em pacientes com autismo, e isso foi medido pelo teste de lactulose/manitol²⁶. Um estudo em particular mostrou que a função intestinal e da barreira hematoencefálica prejudicada no autismo diminuiu o nível dos componentes da junção de oclusão e causou um aumento no nível de claudinas (família de proteínas que são os componentes importantes das junções oclusivas, onde estabelecem a barreira paracelular que controla o fluxo de moléculas no espaço intercelular entre as células de um epitélio) no cérebro de indivíduos com TEA quando comparado a um grupo de controles²⁷. O aumento da permeabilidade intestinal ocasiona uma elevação no tráfego de substâncias não desejadas para a corrente sanguínea, podendo originar alterações inflamatórias e imunológicas crônicas, tanto em nível local como sistêmico. Esta alteração é conhecida como *“leaky gut”*. Estudos têm mostrado evidências de aumento de metabólitos na urina e circulação sistêmica em indivíduos com TEA²⁸.

Uma importante molécula que está diretamente relacionada com a regulação da permeabilidade intestinal é a zonulina. A zonulina, descoberta em 2000 em um estudo conduzido pelo pediatra Alessio Fasano, é uma proteína precursora da haptoglobina 2, que tem como papel fisiológico a modulação da permeabilidade das junções entre as células da parede intestinal. Secretada pelo tecido epitelial do intestino, a zonulina executa diferentes ações como a regulação dos fluidos e de grandes moléculas presentes na mucosa intestinal²⁹. Verificou-se que esta enzima que regula a permeabilidade intestinal está significativamente aumentada em indivíduos com autismo portadores de sintomas gastrointestinais³⁰.

Novamente, uma barreira intestinal rompida permite que endotoxinas entrem na corrente sanguínea. Por exemplo, o lipopolissacarídeo é uma endotoxina potente que altera a atividade neuronal e microglial na amígdala, uma

região envolvida no controle das emoções³¹. Em pacientes com autismo, os níveis séricos de LPS são significativamente altos quando comparados a indivíduos saudáveis, e isso poderia estar relacionado com prejuízo no comportamento social³². Visar a melhora na barreira epitelial no autismo pode reduzir a entrada de endotoxinas microbianas, normalizando assim a via intestinal-cerebral.

Entre os principais causadores do aumento da liberação de zonulina e, conseqüentemente, o aumento da permeabilidade intestinal, estão a disbiose na microbiota intestinal, tema que será abordado mais afundo na próxima sessão, e o glúten³³. A gliadina, conhecida como a fração proteica do glúten presente no trigo, é responsável pela ativação da sinalização da zonulina, independentemente da expressão genética. Essa ativação leva ao aumento da permeabilidade intestinal, efeito que permite a passagem do glúten e outras endotoxinas aos tecidos e que induz sua interação com elementos geneticamente sensibilizados do sistema imune³⁴.

4.4 MICROBIOTA

Os seres humanos, ao nascer, herdamos dois genomas diferentes: o genoma humano, que é herdado do pai e da mãe, é estável e raramente muda sua composição, e o genoma da microbiota, que é herdado da mãe (ou do ambiente dependendo do tipo de parto), extremamente dinâmico e difere de indivíduo para indivíduo e no mesmo indivíduo durante o tempo.

O trato gastrointestinal humano representa uma das maiores interfaces (250-400 m²) entre o hospedeiro, fatores ambientais e antígenos no corpo humano³⁵. A coleção de bactérias, vírus e fungos que colonizam o trato GI é denominada 'microbiota intestinal' e coevoluiu com o ser humano ao longo de milhares de anos para formar uma relação mutualmente benéfica³⁶.

O número de microrganismos que habita o trato GI foi estimado em mais de 10¹⁴, o que abrange, aproximadamente, 10 vezes mais células bacterianas do que o número de células humanas e mais de 100 vezes a quantidade de conteúdo genômico (microbioma) do que o genoma humano³⁶.

A microbiota oferece muitos benefícios ao hospedeiro, por meio de uma série de funções fisiológicas, como fortalecimento da integridade intestinal ou

formação do epitélio intestinal³⁷, captação de energia³⁸, proteção contra patógenos³⁹ e regulação da imunidade do hospedeiro⁴⁰.

Existem evidências de que a composição da microbiota se inicia ainda durante a fase de gravidez, na placenta¹⁰¹. Micróbios completam a colonização do intestino neonatal imediatamente após o nascimento. Acredita-se que o estabelecimento e o desenvolvimento interativo dessa microbiota intestinal inicial são (pelo menos parcialmente) impulsionados pelo parto e modulados por compostos específicos presentes no leite humano. Evidencia-se de que o parto normal (vaginal) traga mais benefícios para o recém-nascido, visto que esse adquire todas as bactérias presentes na microbiota vaginal da mãe. No caso da cesárea, o recém-nascido é exposto primeiramente ao ambiente e a equipe médica, adquirindo uma microbiota desconhecida.

Aproximadamente 93.5% das bactérias são representadas por apenas 4 filos: Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroides⁵⁰. Esses microrganismos têm funções estruturais e protetoras para os humanos, como a formação da parede intestinal, o desenvolvimento dos sistemas imunológico e endócrino, o aumento da resistência à colonização de patógenos, a desintoxicação e degradação de xenobióticos, a produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e vitaminas, absorção de nutrientes e síntese de aminoácidos a partir de amônia ou ureia⁵¹. A fermentação de carboidratos não digeríveis pela microbiota intestinal, levando à produção de ácidos graxos de cadeia curta, tem um papel em vários processos no intestino, como proliferação e diferenciação celular, adsorção de íons e água, secreção de hormônios e produção de citocinas (fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL-2, IL-6, IL-10) que, por sua vez, ativam o sistema imunológico e regulam a função leucocitária. Além disso, competindo por espaço e nutrientes e produzindo substâncias antimicrobianas, as bactérias comensais podem inibir efetivamente o crescimento e a proliferação de patógenos, contribuindo para manter uma microbiota intestinal saudável e equilibrada⁵².

Entre as bactérias comensais, as do gênero Bifidobactérias são geralmente consideradas entre as bactérias benéficas mais relevantes e, além das variações

devido à dieta e idade, representam cerca de 10% da microbiota humana adulta. Juntamente com os Lactobacilos, incluindo aqueles derivados do leite materno, as Bifidobactérias contribuem para um intestino infantil saudável, modulando a resposta imune natural e adquirida⁵³.

A ligação entre os sintomas gastrointestinais, microbiota e os distúrbios do neurodesenvolvimento foi primeiramente estudada por Sandler et al⁴⁸, em 1999. Richard Sandler notou que vários pais de crianças com autismo de início regressivo relataram o seguinte padrão de sequência em seus filhos: uso repetido de antimicrobianos de amplo espectro (geralmente para otite média crônica), seguido de diarreia crônica, perda de linguagem e habilidades sociais e subsequente início de sintomas autistas. Eles então sugeriram que o uso repetido de antimicrobianos poderia causar um desequilíbrio na microbiota intestinal e possibilitar a proliferação de bactérias produtoras de neurotoxinas, como bactérias do gênero *Clostridium*. Para testar a hipótese de que a microbiota pudesse afetar os sintomas neurocomportamentais dos indivíduos com TEA, o grupo sugeriu um estudo clínico, onde crianças do sexo masculino diagnosticadas com TEA de aproximadamente 4 anos e meio e com sintomas gastrointestinais seguissem um tratamento com vancomicina oral (125 mg, 4 vezes por dia) durante 12 semanas. A vancomicina não foi escolhida por acaso. Este antibiótico foi escolhido por ser administrado por via oral, não ser absorvido pelo intestino e ter alta seletividade por bactérias do gênero *Clostridium*. Verificou-se que, durante as 12 semanas de tratamento, os indivíduos tiveram uma melhora significativa nos sintomas comportamentais, indicando uma possível relação entre microbiota e autismo e uma conexão entre intestino e cérebro. Porém, logo após a retirada da vancomicina, observou-se que os indivíduos voltaram a apresentar os mesmos sintomas que apresentavam antes de serem recrutados para o estudo, evidenciando um efeito apenas a curto prazo⁴⁸. A recaída e persistência dos efeitos do *Clostridium* após a descontinuação da vancomicina é provavelmente devido à germinação de esporos, assim como a recaída dos sintomas autistas⁵⁵. Muitos estudos, então, começaram a surgir para estudar e entender a microbiota intestinal em indivíduos com TEA e como seria possível alterar a microbiota de

uma maneira duradora, a fim de que os benefícios se prolongassem por mais tempo.

Na tentativa de traçar o perfil da microbiota de indivíduos com TEA, vários estudos foram e continuam sendo realizados, principalmente os comparando com irmãos saudáveis e controles não relacionados. O desequilíbrio na composição do intestino microbiano em amostras de TEA é bem declarado, especialmente quando comparado com controles saudáveis não relacionados⁵⁴.

A microbiota de indivíduos com TEA é significativamente diferente daquele dos controles e consiste em mais de 1000 espécies diferentes em comparação com 530 de crianças saudáveis⁵⁶. Além disso, em uma perspectiva de filo, a microbiota dos pacientes com TEA apresenta menos quantidade de Firmicutes e Actinobacteria, especialmente Bifidobacteria. De outro lado, a microbiota dos pacientes com TEA apresenta maior quantidade de Bacteroidetes e Proteobacteria (Sutterella) com relação aos controles⁵⁶. A diminuição das Bifidobactérias, bactérias que ajudam as crianças a desenvolver imunidade inata, na microbiota de TEA, pode explicar o crescimento excessivo de patógenos. Embora Firmicutes estejam menos representadas em seu complexo, bactérias do gênero Clostridium são as mais abundantes em crianças com TEA com distúrbios gastrointestinais.

Embora Bacteroidetes estejam em grandes quantidades, uma presença significativamente menor do gênero Prevotella e outros fermentadores foi descrita no intestino de crianças com TEA com distúrbios gastrointestinais em relação a controles saudáveis. Essas diferenças microbianas foram mais estritamente correlacionadas à gravidade dos sintomas autistas do que a distúrbios gastrointestinais⁵⁷. Prevotella não só tem a capacidade de sintetizar vitamina B1, que atenua os sintomas de TEA⁵⁸, mas também é considerado um nicho central para manter a estrutura da comunidade da microbiota intestinal humana saudável⁵⁹.

Por outro lado, bactérias do gênero Clostridium, que estão em alta quantidade no intestino de pacientes com TEA, produzem alguns metabólitos, como fenol, p-cresol e derivados de indol, que são potencialmente tóxicos para humanos e ácido propiônico⁶⁰, um ácido graxo de cadeia curta, capaz de passar a

barreira intestinal e hematoencefálica e alterar processos neurofisiológicos pela ligação da acetil-CoA e sequestrando a acetil-carnitina envolvida no transporte mitocondrial de lipídios. Experimentos recentes demonstraram que a administração de ácido propiônico a modelos de ratos jovens causou o desenvolvimento de atraso mental com deficiências cognitivas, resposta de neuroinflamação inata e sintomas comportamentais restritos e repetitivos consistentes com autismo humano⁶⁰.

O crescimento excessivo de fungos, em particular de *Candida*, também foi relatado como infecção intestinal em alguns pacientes autistas⁵⁴. No intestino de indivíduos saudáveis, *Candida* existe apenas em pequenas colônias, mantidas sob controle do sistema imunológico humano. Se se torna invasivo, produz estruturas semelhantes a raízes que atravessam as paredes intestinais aumentando a permeabilidade do intestino, que permite que endotoxinas entrem na corrente sanguínea. Essas moléculas então podem gerar inflamação, intolerância alimentar e alergias. Em um trabalho recente, a candidíase e o aumento da permeabilidade intestinal se correlacionam com um subconjunto (36,7%) de pacientes autistas⁶¹.

Por fim, a disbiose, desequilíbrio da microbiota intestinal, estimula a liberação de zonulina e, conseqüentemente, perda funcional da função da barreira intestinal e aumento da permeabilidade intestinal, seguida por tráfego de endotoxina do lúmen para a lâmina própria. As células intestinais têm capacidade de secretar zonulina quando há disbiose ou grande quantidade de microrganismo no intestino delgado⁴². Digno de nota, a ativação da via da zonulina parece ser um mecanismo de defesa inato do hospedeiro, que tem como objetivo eliminar os microrganismos e contribuir para a resposta do hospedeiro contra a colonização bacteriana do intestino delgado⁴³.

Uma grande porcentagem de pacientes com autismo tem uma história de uso extensivo de antibióticos. Antibióticos β -orais (isto é, lactâmicos) interrompem a microbiota protetora e causam a proliferação de bactérias anaeróbicas no intestino, como por exemplo, *Clostridium*, *Bacteroidetes* e *Desulfovibrio* são bactérias comuns que podem promover sintomas gastrointestinais e comportamentos autistas em indivíduos com TEA⁶².

Ainda se discute bastante a ordem de causa-efeito entre microbiota e TEA. Muitos estudos indicam a disbiose como uma consequência do TEA e, muitas vezes, por conta do restrito padrão alimentar que um paciente com TEA segue. Porém, estudos recentes mostram que a disbiose pode estar relacionada na patogênese do TEA, visto que muitas vezes os sintomas neurocomportamentais só aparecem após o uso de antibióticos, que causam um desequilíbrio na microbiota. Assim como há evidências de que o parto por cesárea traz uma maior chance do recém-nascido vir a desenvolver TEA, pois o indivíduo não adquire a microbiota vaginal da mãe no nascimento¹⁰².

4.5 EIXO INTESTINO-CÉREBRO

Para que faça sentido algumas das hipóteses entre disbiose e sintomas neurocomportamentais, é necessário que exista uma comunicação entre intestino e cérebro.

O eixo intestino-cérebro consiste na comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central e o entérico, ligando os centros emocionais e cognitivos do cérebro às funções intestinais periféricas⁴⁶. A comunicação bidirecional atua por meio do mecanismo neuroendócrino e neuroimune que envolve tanto o sistema nervoso autônomo (SNA) quanto o sistema nervoso entérico (SNE). Os componentes morfológicos fundamentais do cérebro para a sinalização da microbiota intestinal são os nervos simpático e parassimpático do SNA⁴⁴. O sistema simpático inibe as funções motoras intestinais e diminui a secreção intestinal. Em condições de estresse, o sistema simpático é superativado, a integridade do epitélio intestinal é destruída e a motilidade intestinal e as secreções são alteradas⁴⁵. O nervo vago é a via neural mais importante na conexão cérebro-intestino, permitindo o fluxo de informações das vísceras para o SNC.

Visto que o eixo intestino-cérebro é uma via bidirecional, assim como mudanças intestinais induzidas por estresse podem alterar o habitat das bactérias residentes e promover alterações na composição e atividade da microbiota⁴⁷, a microbiota intestinal também pode enviar seus sinais ao cérebro através do nervo vago⁶³.

Como é sabido, a disbiose em pacientes com TEA causa o aumento da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, diversas substâncias que normalmente não atravessam essa barreira conseguem realizar essa passagem e atingir o nervo vago ou cair na corrente sanguínea e atravessar barreira hematoencefálica. De todo jeito, essas substâncias terão um efeito no cérebro do indivíduo. Além de aumentar a permeabilidade intestinal, a disbiose também causa uma produção exacerbada ou escassa de substâncias produzidas pelas bactérias que alterarão as funções normais do sistema.

4.5.1 ÁCIDO PROPIÔNICO

O ácido propiônico é um ácido orgânico, produzido por bactérias do gênero *Clostridium*, bactérias que estão em alta quantidade no intestino de pacientes com TEA. O PPA atravessa a parede intestinal, e pode cruzar a barreira hematoencefálica⁶⁴ e causar alterações nos níveis de serotonina, dopamina e glutamato, estimulando a liberação de cálcio⁶⁵. Causa a interrupção do glutamato: transmissão GABAérgica que simula o que ocorre no autismo⁶⁶. Ele libera citocinas pró-inflamatórias, esgota os antioxidantes endógenos e eleva a peroxidase lipídica, levando ao estresse oxidativo⁶⁷.

4.5.2 GABA

Bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobactérias* são capazes de produzir ácido gama-aminobutírico, um importante neurotransmissor inibitório no cérebro⁷⁴. Como esses dois gêneros de bactérias estão em baixa quantidade na microbiota de indivíduos com TEA, apenas uma pequena quantidade de GABA é produzida e isso pode resultar em um equilíbrio anormal de excitação / inibição no cérebro, alteração da sinalização neural, processamento de informações e comportamento de resposta.

Para entender esta relação, em um estudo, camundongos foram administrados com *Lactobacillus rhamnosus* JB-1. Houve uma estimulação da transcrição dos receptores GABA no nervo vago, que induziu efeitos comportamentais e psicológicos que foram revertidos após a vagotomia⁷⁵.

4.5.3 LIPOPOLISSACARÍDEOS

Lipopolissacarídeo (LPS) é um tipo de endotoxina produzida por bactérias gram-negativas (*Desulfovibrio* e *Bacteroides*), que promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e eicosanóides⁶⁸. Pode induzir a ruptura da barreira hematoencefálica aumentando sua permeabilidade e permitindo que exotoxinas, como metais, entrem e se acumulam no cérebro e promovam respostas inflamatórias por meio da ativação da micróglia⁶⁹.

Em pacientes com autismo, os níveis séricos de LPS são significativamente altos quando comparados a indivíduos saudáveis, e isso poderia estar relacionado com prejuízo no comportamento social⁷⁰.

4.5.4 NEUROTOXINAS

A microbiota patogênica e bacteriana estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-8 pelas células epiteliais intestinais, células dendríticas e macrófagos⁷¹, responsáveis por vários processos neuropsiquiátricos transtornos incluindo ansiedade, esquizofrenia, bem como autismo⁷². O estado padrão persistente de tolerância imunológica da mucosa observado na alergia alimentar está fortemente associado a uma composição alterada da microbiota, como *Bacteroidetes*. A maioria das alergias é caracterizada por uma resposta imune do tipo T-helper 2 com as citocinas interleucina (IL4, IL5 e IL13). Apoiando o papel da alergia no autismo, as crianças produziram níveis significativamente mais elevados das citocinas mencionadas⁷³.

4.5.5 TEORIA DO EXCESSO DE OPIÓIDES

Quando o trato gastrointestinal (TGI) funciona corretamente, as enzimas decompõem as proteínas em peptídeos e depois em aminoácidos. Este último é absorvido pela corrente sanguínea e transportado para o corpo. Algumas interrupções neste processo são consideradas associadas ao TEA e são chamadas de teoria do excesso de opioides. Opioides são um grupo de compostos químicos que afetam a função do cérebro e do sistema nervoso. Esses compostos influenciam a percepção da emoção e do comportamento. A principal suposição desta teoria é que, como visto anteriormente, alguns indivíduos com

TEA sofrem de aumento da permeabilidade intestinal e produção inadequada de enzimas digestivas relacionadas ao glúten e caseína. Níveis inadequados dessas enzimas resultam em falhas na transformação do glúten e da caseína em aminoácidos. Consequentemente, o aumento da permeabilidade intestinal permite o vazamento para a corrente sanguínea, onde os metabólitos (gluteomorfina e caseínamorfina), que são estruturalmente semelhantes às endorfinas e têm propriedades agonistas de opiáceos passem pela barreira hematoencefálica causando interrupção do funcionamento normal do sistema nervoso, regulando a transdução de sinal no cérebro. Os achados relataram que a eliminação de alimentos contendo glúten e caseína da dieta dessas crianças resultou no desaparecimento dos sintomas associados ao TEA⁷⁶.

Considerando que a microbiota assume um importante papel nos sintomas gastrointestinais e neurocomportamentais de uma parte dos indivíduos com TEA, novos tratamentos propõem uma intervenção com o objetivo de reequilibrar a microbiota intestinal, diminuindo a permeabilidade intestinal e diminuindo a produção de endotoxinas que afetam o tecido epitelial intestinal e o cérebro desses pacientes.

4.6 TRATAMENTOS

Tratamentos que reequilibrem a microbiota intestinal e diminuam a permeabilidade intestinal parecem exercer um papel muito importante neste caso de TEA. Este tratamento poderia ser realizado de diversas maneiras, como, por exemplo, dietas mais equilibradas com alta variedade de alimentos ricos em nutrientes e fibras, suplementação com probióticos e prebióticos e, até mesmo, transplante de microbiotas de pessoas saudáveis para indivíduos com TEA (transplante fecal/microbiota).

Entretanto, fazer a reeducação alimentar de indivíduos com TEA pode ser um desafio e tanto. Os pais de crianças com TEA relatam muitos problemas de alimentação, incluindo recusa de alimentos, ingestão alimentar limitada e problemas de comportamento na hora das refeições, com vários estudos de caso ao longo dos anos apoiando as preocupações dos pais⁷⁷. Comportamentos

repetitivos e restritos são características básicas do transtorno do espectro do autismo, que pode desempenhar um papel na seletividade alimentar. Crianças com TEA frequentemente resistem a novas experiências, que podem incluir saborear novos alimentos devido à sua hipersensibilidade em relação às propriedades sensoriais dos alimentos, incluindo textura, cor e temperatura⁸⁰, apresentação dos alimentos⁸¹ ou outras características dos alimentos.

Não é surpreendente que as crianças com TEA consumam um volume significativamente menor de comida em comparação com seus irmãos não TEA⁷⁸. Em um estudo, pelo menos 78% das crianças com TEA omitiram um ou mais grupos de alimentos e apresentaram comportamentos problemáticos durante as refeições, como empurrar comida, virar a cabeça, chorar, sair da mesa e fazer declarações negativas⁷⁸. Da mesma forma, Bandini et al.⁷⁹ relataram que crianças com TEA recusaram mais alimentos e tinham um repertório alimentar menor do que crianças com desenvolvimento típico da mesma faixa etária. Esses achados podem ser parcialmente explicados pela rigidez comportamental e intolerância a novos alimentos.

Portanto, fora a dieta *gluten-free casein-free*, que será explicada abaixo e parece ajudar na diminuição da permeabilidade intestinal e sintomas neurocomportamentais, os demais tratamentos são realizados principalmente em forma de capsulas (administração oral) e intervenções médicas, visto o desafio em modificar o padrão alimentar de um indivíduo com TEA.

4.6.1 DIETA GLUTEN-FREE CASEIN-FREE

A dieta *gluten-free casein-free* consiste, basicamente, na remoção de proteínas do tipo glúten e caseína (encontradas no trigo, centeio, cevada e produtos lácteos, respectivamente) da dieta de crianças com TEA. Isso se deve à dois fatores principais: primeiramente, o glúten parece causar um aumento na permeabilidade intestinal, facilitando o acesso de endotoxinas ao eixo intestino-cérebro e o efeito nocivo no cérebro e no próprio intestino, e o segundo é, como já foi discutido na seção anterior, a teoria de que mudanças no metabolismo dessas proteínas específicas podem resultar em níveis elevados de peptídeos opioides

que, por sua vez, podem afetar o sistema nervoso central e impactar negativamente no comportamento.

Ghalichi et al.⁸² conduziram um ensaio clínico randomizado no qual crianças com TEA foram designadas ou para uma dieta sem glúten ou sua dieta regular. Aqueles no grupo "sem glúten" exibiram uma diminuição significativa nos sintomas gastrointestinais e comportamentos estereotipados com comunicação e interação social ligeiramente melhoradas, enquanto aqueles que mantiveram uma dieta regular na verdade mostraram um aumento significativo em seus sintomas gastrointestinais após 6 semanas⁸². Outro estudo relatou que, em comparação com controles, crianças com TEA tinham níveis mais elevados de anticorpos específicos da caseína, e seus sintomas de TEA pareceram melhorar após 8 semanas com a dieta de eliminação do leite de vaca⁸³.

4.6.2 PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS

As combinações potencialmente sinérgicas de pró e prebióticos são chamadas de simbióticos.

Probióticos são microrganismos vivos (por exemplo, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* spp.) que ocorrem naturalmente em certos alimentos (frequentemente fermentados), como iogurte e kefir, ou podem ser adicionados à dieta por meio de cápsulas suplementares. Os prebióticos são compostos encontrados em alimentos (geralmente ricos em fibras) que promovem seletivamente o crescimento e a colonização das bactérias intestinais saudáveis. Melhorar a saúde intestinal por meio da ingestão de probióticos ou prebióticos dietéticos pode melhorar algumas das questões relacionadas ao intestino associadas ao TEA.

Foi demonstrado que os probióticos aliviam a disfunção gastrointestinal comumente associada ao TEA por uma série de mecanismos⁸⁴. Por exemplo, os probióticos podem reduzir a permeabilidade intestinal e reconstruir ou estabilizar a barreira intestinal por meio do reequilíbrio da microbiota e aumento da produção de mucina⁸⁵. Eles também produzem enzimas digestivas que metabolizam compostos potencialmente tóxicos e irritantes (como a caseína e glúten)⁸⁶,

sintetizam antioxidantes que protegem o intestino de patógenos⁸⁷ e modulam as respostas imunológicas.

Uma mistura probiótica das espécies *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* atenuou os níveis elevados de *Clostridium* e reverteu sintomas neurocomportamentais persistentes induzidos por ácido propiônico em jovens hamsters machos⁸⁸.

Em uma amostra de alimentação duplamente cega, controlada por placebo e cruzada, uma amostra de 17 indivíduos com TEA tomou um probiótico (*Lactobacillus plantarum* WCSF1) por 12 semanas. O suplemento aumentou significativamente as bactérias *Lactobacilli* e *Enterococci* e reduziu as bactérias *Clostridium* no intestino e diminuiu significativamente os distúrbios comportamentais e emocionais⁹⁰.

O primeiro estudo a avaliar prebióticos a suplementação em pacientes com TEA demonstrou que um galacto-oligossacarídeo, em combinação com uma dieta sem glúten e caseína, melhorou o crescimento de bactérias benéficas e aumentou a diversidade da microbiota intestinal⁹¹.

Os micróbios probióticos são introduzidos artificialmente nos alimentos no momento de sua produção. A maioria das culturas estão disponíveis comercialmente de forma extremamente concentrada forma tratada como pó liofilizado ou culturas congeladas altamente concentradas. Alguns dos microrganismos probióticos popularmente usados são *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacteria* e certas cepas de *Lactobacillus casei* e grupo *Lactobacillus acidophilus*. Outros micróbios incluem *Bacillus coagulans*; Cepas de *Escherichia coli*; certos enterococos, especialmente *Enterococcus faecium* SF68; e a levedura *Saccharomyces boulardii*. Os produtos probióticos podem conter uma única cepa ou uma mistura de duas ou mais cepas. O efeito dos probióticos é muito específico da cepa e não pode ser generalizado. Uma única cepa pode apresentar benefícios diferentes quando usada individualmente e em combinação. Os benefícios de um probiótico a formulação também difere de acordo com o grupo de pacientes⁹².

A partir dos resultados obtidos por pesquisadores ao examinar um grupo de crianças com TEA (n=22) de quatro a dez anos, onde os pacientes receberam uma dieta sem açúcar e cápsulas probióticas de *L. acidophilus* (5×10^9 UFC / g) para um período de 2 meses, duas vezes ao dia, grandes mudanças foram observadas nos sintomas comportamentais com melhora significativa na concentração e na capacidade de seguir as instruções. No entanto, não houve melhora em outros comportamentos distintos e na capacidade de fazer contato visual⁹³.

4.6.3 TRANSPLANTE FECAL/MICROBIOTA

O transplante fecal/microbiota é a transferência de bactérias intestinais de um doador saudável, onde há simbiose, com o objetivo de proporcionar benefícios à saúde de quem o recebe por meio da reconstituição da sua microbiota intestinal e pelo combate as bactérias patogênicas. Para que isso seja possível, algumas etapas prévias devem ocorrer, pois há um risco biológico alto envolvido neste processo.

Primeiramente ocorre uma verificação das fezes que serão doadas. O doador deve estar livre de infecções virais e infecto-parasitárias. Avalia-se também doenças gastrointestinais, metabólicas e neurológicas. Por fim, verifica-se o uso de antibióticos, probióticos ou quimioterápicos nos últimos 3 meses. Caso positivo, o doador não poderá realizar o procedimento.

Em seguida, caso as fezes estejam de acordo com os pré-requisitos, ocorre o processamento das fezes. As fezes do doador são coletadas em um hospital com infraestrutura adequada e processadas por um laboratório habilitado. Aproximadamente 200 g de fezes são misturadas com água ou soro fisiológico para obter um total de 250 ml de solução. Esta solução ainda é filtrada para remoção de partículas grosseiras.

Por fim, esta solução é inserida no paciente sedado, pela boca ou pelo ânus, e pode ser gotejada tanto no intestino delgado, quanto no intestino grosso. Isso dependerá do método de inserção. Após o procedimento, o paciente recebe alta e é monitorado para acompanhar os resultados. Em termos de risco, o transplante fecal/microbiota é considerado um procedimento seguro se realizado

corretamente, no entanto, alguns efeitos adversos foram documentados. Os efeitos colaterais variam de diarreia e prisão de ventre a febre e dor abdominal, os quais não duram mais do que uma semana após o tratamento¹⁰³.

O transplante fecal/microbiota parece ser uma técnica moderna, porém o primeiro caso documentado de material fecal ingerido para fins medicinais é datado 1700 anos atrás. Foi um antigo pesquisador chinês do século IV, chamado Ge Hong, quem primeiro usou o que ele chamou de "sopa amarela" para tratar seus pacientes com diarreia severa⁹⁵.

O transplante fecal/microbiota, como uma terapia alvo da microbiota, é indiscutivelmente muito eficaz para curar a infecção por *Clostridium difficile* e tem bons resultados em outras doenças intestinais⁹⁶.

O transplante de fezes geralmente envolve apenas uma única dose para infecção recorrente por *Clostridium difficile*⁹⁷ e outras condições gastrointestinais. Um estudo demonstrou que apenas a infecção por *Clostridium difficile* responde a uma ou duas infusões transplante fecal/microbiota. Todos os outros problemas gastrointestinais, requerem múltiplas infusões da microbiota do doador para alcançar benefícios mensuráveis e de longa duração, incluindo aqueles associados com TEA⁹⁸.

Em 2017, Kang, DW et al⁹⁹ projetou um estudo clínico, aberto, para investigar a segurança, tolerabilidade e eficácia do transplante fecal/microbiota para sintomas gastrointestinais e comportamentais em crianças com TEA. O tratamento de longo prazo foi administrado em 18 crianças com problemas gastrointestinais e TEA. Respostas clínicas, bactérias intestinais e perfis de DNA foram monitorados por 18 semanas. Resumidamente, este protocolo envolveu 14 dias de tratamento oral com vancomicina seguido por 12–24 horas de jejum com limpeza intestinal e, em seguida, repovoamento da microbiota intestinal pela administração de uma alta dose inicial de Microbiota Humana Padronizada (SHGM - Preparação congelada padronizada para transplante de microbiota fecal para infecção recorrente por *Clostridium difficile*) por via oral ou retal seguida por doses orais diárias de manutenção mais baixas com um supressor de ácido gástrico por 7–8 semanas. Um supressor de ácido estomacal foi usado para aumentar a

sobrevivência de SHGM através do estômago. Os participantes foram acompanhados por mais 8 semanas após o término do tratamento, para determinar se os efeitos do tratamento eram temporários ou de longa duração⁹⁹.

Para mensurar os resultados relacionados a problemas gastrointestinais, os pais e responsáveis foram solicitados a preencher a *Gastrointestinal Symptom Rating Scale* (GSRS). O GSRS é uma avaliação dos sintomas gastrointestinais durante a semana anterior, com base em 15 questões, que são pontuadas em cinco domínios: dor abdominal, refluxo, indigestão, diarreia e constipação. O GSRS tem uma escala de sete pontos, onde 1 representa a ausência de sintomas incômodos e 7 representa sintomas muito incômodos. Após o tratamento, observou-se que os sintomas gastrointestinais, melhoraram significativamente para dor abdominal, indigestão, diarreia e constipação. A pontuação GSRS média caiu 82% do início ao final do tratamento e permaneceu melhor (77% de redução da linha de base) mesmo 8 semanas após o tratamento ser interrompido. Apenas duas de 18 crianças com TEA (11%) alcançaram redução de menos de 50% no GSRS médio⁹⁹.

A avaliação PGI-II, que avalia 17 sintomas relacionados ao TEA, revelou melhora significativa durante o tratamento e nenhuma reversão 8 semanas após o término do tratamento⁹⁹.

Após o tratamento, também foi analisada a mudança na microbiota intestinal desses pacientes. A quantidade de Bifidobacterias aumentou significativamente quatro vezes e tornou-se comparável à sua quantidade relativa em crianças neurotípicas. Além disso, as quantidades de Prevotella e Desulfovibrio aumentaram significativamente desde o início até 8 semanas após o tratamento. Esses dados sugerem que este tipo de tratamento muda com sucesso a microbiota de indivíduos com TEA em direção a controles saudáveis de idade e gênero e aos de seus doadores.

As melhorias nos sintomas gastrointestinais e de TEA são consistentes com um ensaio anterior (Sandler et al⁴⁸) de 8 semanas do uso de vancomicina para o tratamento de crianças com TEA⁴⁸, mas uma diferença importante é que no estudo anterior, os benefícios foram perdidos dentro de algumas semanas após a

interrupção terapia com vancomicina, enquanto neste estudo, os benefícios continuaram por pelo menos 8 semanas.

Em 2019, o mesmo grupo de pesquisadores (Kang, DW et al⁹⁹) coletaram dados de acompanhamento dos pacientes que participaram do estudo, 2 anos após o tratamento citado anteriormente. Em resumo, todos os 18 participantes com TEA foram reavaliados dois anos após a interrupção do tratamento com vancomicina e transplante de microbiota e observou-se melhorias significativas tanto nos sintomas gastrointestinais quanto nos sintomas comportamentais em comparação com as medições iniciais coletadas no início do estudo aberto original. Os benefícios gastrointestinais foram mantidos principalmente a partir do final do tratamento, e os sintomas de autismo foram relatados como tendo melhorado significativamente desde o final do tratamento. Mudanças na microbiota intestinal persistiram em dois anos, incluindo na diversidade geral da comunidade e abundâncias relativas de *Bifidobacteria* e *Prevotella*. Essas observações encorajadoras demonstram que a intervenção intensiva de MTT, como é chamado o protocolo de tratamento, é uma terapia promissora para o tratamento de crianças com TEA que têm problemas gastrointestinais¹⁰⁰. Entretanto, o estudo foi aberto e foi susceptível ao efeito placebo. Sugere-se que estudos randomizados e duplo cegos sejam realizados para confirmar os resultados

O transplante fecal/microbiota ainda não é aprovado por órgão regulatórios pelo mundo para qualquer tipo de indicação, pois os estudos clínicos ainda estão em desenvolvimento. Porém, muitas agências reguladoras permitem esse procedimento para pacientes com infecção recorrentes e severas por *Clostridium difficile*.

5 CONCLUSÃO

Como não há nenhum sintoma ou comportamento que identifique os indivíduos com TEA, não existe um tratamento único que seja eficaz para todas as pessoas do espectro. Isso é provavelmente devido ao fato de que o TEA, como muitos outros distúrbios multifatoriais, é o destino final que pode ser alcançado por meio de vários caminhos diferentes.

O TEA não é mais domínio apenas de psiquiatras e educadores especiais. O tratamento de TEA deve ser visto de forma holística, com as disfunções nutricionais e de microbiota sendo abordadas. O autismo continua sendo uma condição desafiadora para os indivíduos e suas famílias. Certamente, as perspectivas hoje em dia são muito melhores do que há uma geração. Hoje, com intervenção e terapia adequadas e personalizadas, os médicos podem ajudar a reduzir muitos dos sintomas do autismo.

De acordo com os artigos revisados, parece existir uma forte relação entre a disbiose e o TEA. Alterações na composição da microbiota intestinal foram confirmadas em crianças com TEA, principalmente em uma alta concentração de bactérias do gênero *Clostridium*. Tanto bactérias do gênero *Clostridium* como outros patógenos produzem certas substâncias tóxicas para o ser humano quando caem na circulação, que é o caso do ácido propiônico. As disfunções gastrointestinais são frequentes em crianças com TEA e podem se correlacionar com a gravidade de sintomas neurocomportamentais, mas não estão presentes em todos os casos de TEA.

A disbiose e a permeabilidade intestinal no TEA é um tópico altamente debatido e seu papel na patogênese da doença, ao invés de ser a consequência ou apenas um epifenômeno, permanece altamente controverso. Evidências de estudos recentes com animais e humanos sugerem uma comunicação bidirecional entre o intestino e o cérebro, o eixo intestino-cérebro. A permeabilidade intestinal aumentada induzida por disbiose e ingestão de glúten possibilita a entrada de endotoxinas, que normalmente não conseguem atravessar a barreira celular, na corrente sanguínea e no nervo vago, onde elas podem migrar para o cérebro e estimular a regulação imunológica defeituosa e, em última análise, a neuroinflamação típica de TEA.

Tratamentos com o objetivo de reequilibrar a microbiota intestinal, como uso de pro e prebióticos e transplante fecal/microbiota, estão sendo altamente estudados e utilizados em pacientes com TEA e vêm demonstrando bons resultados, principalmente na diminuição dos sintomas gastrointestinais e neurocomportamentais. Apesar de serem procedimentos conhecidos e utilizados

na antiguidade, os dois tratamentos ainda estão em fases iniciais de pesquisa. Embora os resultados desses tratamentos sejam positivos e possam ser utilizados como formas inéditas de tratamento para um subgrupo de pacientes com TEA em breve a fim de melhorar a qualidade de vida, ensaios clínicos bem planejados, duplo-cegos, randomizados e controlados por placebo são necessários para validar a eficácia dos procedimentos.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Fattorusso et al. (2019) Fattorusso A, Di Genova L, Dell'Isola GB, Mencaroni E, Esposito S. Autism spectrum disorders and the gut microbiota. *Nutrients*. 2019;11(3):521.
2. What is Autism Spectrum Disorder? Center of Disease Control and Prevention. 25 de março de 2020. Disponível em <<https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/facts.html>> Acesso em 15 de março de 2021.
3. What Is Autism Spectrum Disorder? American Psychiatric Association. Agosto de 2018. Disponível em: <<https://www.psychiatry.org/patients-families/autism/what-is-autism-spectrum-disorder>> Acesso em: 17 de março de 2021.
4. Data & Statistics on Autism Spectrum Disorder. Center for Disease Control and Prevention. 25 de setembro de 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>>. Acesso em 15 de março de 2021.
5. Maenner MJ, Shaw KA, Baio J, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR Surveill Summ* 2020;69(No. SS-4):1–12.
6. Malcom-Smith S., Hoogenhout M., Ing N., Thomas L.G.F., De Vries P. Autism spectrum Disorder, Global challenges and local opportunities. *J Child Adolesc Ment Health*. 2013;25(1):1–5.

7. Garcia-Gutierrez E., Narbad A., Rodriguez J. M. (2020). Autism Spectrum Disorder Associated With Gut Microbiota at Immune, Metabolomic, and Neuroactive Level. *Front. Neurosci.* 14, 578666. 10.3389/fnins.2020.578666
8. Vendrik K. E. W., Ooijevaar R. E., de Jong P. R. C., Laman J. D., van Oosten B. W., van Hilten J. J., et al. (2020). Fecal Microbiota Transplantation in Neurological Disorders. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 10, 98. 10.3389/fcimb.2020.00098
9. Klang, DW., Adams, J.B., Coleman, D. et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep* 9, 5821 (2019).
10. Blumberg SJ, Bramlett MD, Kogan MD, Schieve LA, Jones JR, Lu MC. Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011-2012. *Natl Health Stat Report.* 2013 Mar 20;(65):1-11, 1 p following 11. PMID: 24988818
11. Watson S, McConnell F, Manola E, McConachie H. Interventions based on the Theory of Mind cognitive model for autism spectrum disorder (ASD). *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Mar 21;2014(3):CD008785. doi: 10.1002/14651858.CD008785.pub2. PMID: 24652601; PMCID: PMC6923148.
12. Leigh JP, Du J. Brief Report: Forecasting the Economic Burden of Autism in 2015 and 2025 in the United States. *J Autism Dev Disord.* 2015 Dec;45(12):4135-9. doi: 10.1007/s10803-015-2521-7. PMID: 26183723.
13. S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Hultman C, Larsson H, Reichenberg A. The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA.* 2017;318(12):1182–1184. doi:10.1001/jama.2017.12141
14. Kalkbrenner AE, Windham GC, Serre ML, Akita Y, Wang X, Hoffman K, Thayer BP, Daniels JL. Particulate matter exposure, prenatal and postnatal windows of susceptibility, and autism spectrum disorders. *Epidemiology.* 2015 Jan;26(1):30-42. doi: 10.1097/EDE.0000000000000173. PMID: 25286049.

15. Krakowiak, P., Walker, C. K., Bremer, A. A., Baker, A. S., Ozonoff, S., Hansen, R. L., et al. (2012). Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics*, 129(5), e1121–e1128.
16. Kaushik, G., & Zarbalis, K. S. (2016). Prenatal neurogenesis in autism spectrum disorders. *Frontiers in Chemistry*, 4, 12.
17. Kawicka, A., & Regulska-Ilow, B. (2013). How nutritional status, diet and dietary supplements can affect autism. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(1), 1–12.
18. Lee, B. K., Magnusson, C., Gardner, R. M., Blomström, Å., Newschaffer, C. J., Burstyn, I., et al. (2015). Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 44, 100–105.
19. Al-Farsi, Y. M., Waly, M. I., Al-Sharbaty, M. M., Al-Shafae, M. A., Al-Farsi, O. A., Al-Khaduri, M. M., et al. (2013). Levels of heavy metals and essential minerals in hair samples of children with autism in Oman: A case-control study. *Biological Trace Element Research*, 151, 181–186.
20. Tran, S. S., Jun, H.-I., Bahn, J. H., Azghadi, A., Ramaswami, G., Van Nostrand, E. L., et al. (2019). Widespread RNA editing dysregulation in brains from autistic individuals. *Nature Neuroscience*, 22, 25–36.
21. Newschaffer, C. J., Croen, L. A., Daniels, J., Giarelli, E., Grether, J. K., Levy, S. E., et al. (2007). The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annual Review of Public Health*, 28, 235–258.
22. Fattorusso A., Di Genova L., Dell'Isola G.B., Mencaroni E., Esposito S. Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota. *Nutrients*. 2019; 11:521. doi: 10.3390/nu11030521
23. Kawicka, A., & Regulska-Ilow, B. (2013). How nutritional status, diet and dietary supplements can affect autism. A review. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64, 1–12.
24. Valicenti-McDermott, M., McVicar, K., Rapin, I., Wershil, B. K., Cohen, H., & Shinnar, S. (2006). Frequency of gastrointestinal symptoms in children with

- autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, 27, S128–S136.
25. Obrenovich M. Leaky Gut, Leaky Brain? *Microorganisms*. 2018;6:107. doi: 10.3390/microorganisms6040107
 26. de Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Frolli, A., Iardino, P., et al. (2010, October). Alterations of the intestinal barrier in patients with autism and in their first-degree relatives. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 51(4), 418–424.
 27. Fiorentino, M., Sapone, A., Senger, S., Camhi, S. S., Kadzielski, S. M., Buie, T. M., et al. (2016). Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Molecular Autism*, 7, 49.
 28. Ming X, Stein TP, Barnes V, Rhodes N, Guo L. Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: a metabolomics study. *J Proteome Res*. 2012 Dec 7;11(12):5856-62. doi: 10.1021/pr300910n. Epub 2012 Nov 9. PMID: 23106572.
 29. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*. 2016 Oct 21;4(4):e1251384. doi: 10.1080/21688370.2016.1251384. PMID: 28123927; PMCID: PMC5214347.
 30. Esnafoglu E, Cırrık S, Ayyıldız SN, Erdil A, Ertürk EY, Dağlı A, Noyan T. Increased Serum Zonulin Levels as an Intestinal Permeability Marker in Autistic Subjects. *J Pediatr*. 2017 Sep; 188:240-244. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.04.004. Epub 2017 May 11. PMID: 28502607.
 31. Haba, R., Shintani, N., Onaka, Y., Wang, H., Takenaga, R., Hayata, A., et al. (2012, March 17). Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala. *Behavioural Brain Research*, 228(2), 423–431.

32. Emanuele, E., Orsi, P., Boso, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., et al. (2010, March). Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neuroscience Letters*, 471(3), 162–165.
33. El Asmar R, Panigrahi P, Bamford P, Berti I, Not T, Coppa GV, Catassi C, Fasano A. Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*. 2002 Nov;123(5):1607-15. doi: 10.1053/gast.2002.36578. Erratum in: *Gastroenterology* 2003 Jan;124(1):275. El Asmar Rahzi [corrected to El Asmar Ramzi]. PMID: 12404235.
34. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, Thakar M, Iacono G, Carroccio A, D'Agate C, Not T, Zampini L, Catassi C, Fasano A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. 2006 Apr;41(4):408-19. doi: 10.1080/00365520500235334. PMID: 16635908.
35. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*. 1998 Jan;42(1):2-7. doi: 10.1136/gut.42.1.2. PMID: 9505873; PMCID: PMC1726957.
36. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1915-20. doi: 10.1126/science.1104816. PMID: 15790844.
37. Natividad JM, Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):42-51. doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.007. Epub 2012 Oct 23. PMID: 23089410.
38. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. 2013 Sep;54(9):2325-40. doi: 10.1194/jlr.R036012. Epub 2013 Jul 2. PMID: 23821742; PMCID: PMC3735932.

39. Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016 Jul 7;535(7610):85-93. doi: 10.1038/nature18849. PMID: 27383983; PMCID: PMC5114849.
40. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*. 2016 Apr 29;352(6285):539-44. doi: 10.1126/science.aad9378. PMID: 27126036; PMCID: PMC5050524.
41. Hugon P, Dufour JC, Colson P, Fournier PE, Sallah K, Raoult D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect Dis*. 2015 Oct;15(10):1211-1219. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00293-5. Epub 2015 Aug 23. PMID: 26311042.
42. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: Role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Research*. 2020; 9:69. doi: 10.12688/f1000research.20510.1.
43. Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1258:25-33
44. Li, Q., & Zhou, J.-M. (2016, June). The microbiota–gut–brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience*, 324, 131–139.
45. Snoek, S. A., Verstege, M. I., Boeckxstaens, G. E., van den Wijngaard, R. M., & de Jonge, W. J. (2010, October). The enteric nervous system as a regulator of intestinal epithelial barrier function in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 4(5), 637–651.
46. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol*. 2015;28:203–209
47. Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012, November). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(11), 735–742.

48. Sandler, R. H. et al. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *Journal of Child Neurology* 15, 429–435, <https://doi.org/10.1177/088307380001500701> (2000).
49. Mezzelani, A., Landini, M., Facchiano, F., Raggi, M. E., Villa, L., Molteni, M., et al. (2015). Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: A translational hypothesis for regressive autism pathogenesis. *Nutritional Neuroscience*, 18, 145–161.
50. Mezzelani A., Landini M., Facchiano F., Raggi M.E., Villa L., Molteni M., De Santis B., Brera C., Caroli A.M., Milanese L., et al. Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: A translational hypothesis for regressive autism pathogenesis. *Nutr. Neurosci.* 2014;18:145–161. doi: 10.1179/1476830513Y.0000000108
51. Weber TK, Polanco I. Gastrointestinal microbiota and some children diseases: a review. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:676585. doi: 10.1155/2012/676585. Epub 2012 Oct 30. PMID: 23197978; PMCID: PMC3503313.
52. O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, Macsharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony L, Shanahan F. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology.* 2006 Jun;118(2):202-15. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02358. x. PMID: 16771855; PMCID: PMC1782284.
53. Turrone F, Ribbera A, Foroni E, van Sinderen D, Ventura M. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008 Jun;94(1):35-50. doi: 10.1007/s10482-008-9232-4. Epub 2008 Mar 13. PMID: 18338233.
54. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* 2011 Mar 16;11:22. doi: 10.1186/1471-230X-11-22. PMID: 21410934; PMCID: PMC3072352.

55. Finegold SM. Therapy and epidemiology of autism--clostridial spores as key elements. *Med Hypotheses*. 2008;70(3):508-11. doi: 10.1016/j.mehy.2007.07.019. Epub 2007 Sep 29. PMID: 17904761.
56. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, Youn E, Summanen PH, Granpeesheh D, Dixon D, Liu M, Molitoris DR, Green JA 3rd. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. 2010 Aug;16(4):444-53. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.06.008. Epub 2010 Jul 9. PMID: 20603222.
57. Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, Krajmalnik-Brown R. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One*. 2013 Jul 3;8(7):e68322. doi: 10.1371/journal.pone.0068322. PMID: 23844187; PMCID: PMC3700858.
58. Lonsdale D, Shamberger RJ, Audhya T. Treatment of autism spectrum children with thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide: a pilot study. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002 Aug;23(4):303-8. PMID: 12195231.
59. Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Jul;18 Suppl 4:2-4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x. PMID: 22647038.
60. MacFabe DF, Cain NE, Boon F, Ossenkopp KP, Cain DP. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behav Brain Res*. 2011 Feb 2;217(1):47-54. doi: 10.1016/j.bbr.2010.10.005. Epub 2010 Oct 16. PMID: 20937326.
61. de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Froli A, Iardino P, Carteni M, De Rosa M, Francavilla R, Riegler G, Militeri R, Bravaccio C. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Oct;51(4):418-24. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181dcc4a5. PMID: 20683204.

62. MacFabe, D. F. (2015, May 29). Enteric short-chain fatty acids: Microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: Implications in autism spectrum disorders. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 26, 28177.
63. Li, Q., & Zhou, J.-M. (2016, June). The microbiota–gut–brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience*, 324, 131–139.
64. Karuri, A. R., Dobrowsky, E., & Tannock, I. F. (1993). Selective cellular acidification and toxicity of weak organic acids in an acidic microenvironment. *British Journal of Cancer*, 68, 1080–1087.
65. DeCastro, M., Nankova, B. B., Shah, P., et al. (2005). Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 142, 28–38.
66. Cannizzaro, C., Monastero, R., Vacca, M., & Martire, M. (2003). [3H]-DA release evoked by low pH medium and internal H⁺ accumulation in rat hypothalamic synaptosomes: Involvement of calcium ions. *Neurochemistry International*, 43, 9–17.
67. Choi, J., Lee, S., Won, J., et al. (2018). Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. *PLoS One*, 13, e0192925.
68. Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. Philadelphia: Elsevier Health Sciences Division;2014.
69. Banks WA, Gray AM, Erickson MA, Salameh TS, Damodarasamy M, Sheibani N, et al. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *J Neuroinflammation* 2015;12:223.
70. Emanuele, E., Orsi, P., Boso, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., et al. (2010, March). Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neuroscience Letters*, 471(3), 162–165.

71. Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012, September 13). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), 231–241.
72. Petra, A. I., Panagiotidou, S., Hatzigelaki, E., Stewart, J. M., Conti, P., & Theoharides, T. C. (2015, May 1). Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. *Clinical Therapeutics*, 37(5), 984–995.
73. Molloy, C. A., Morrow, A. L., Meinzen-Derr, J., Schleifer, K., Dienger, K., Manning-Courtney, P., et al. (2006, March). Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *Journal of Neuroimmunology*, 172(1–2), 198–205
74. Esnafoglu, E., Cırrık, S., Ayyıldız, S. N., Erdil, A., Ertürk, E. Y., Dağlı, A., et al. (2017). Increased serum zonulin levels as an intestinal permeability marker in autistic subjects. *The Journal of Pediatrics*, 188, 240–244.
75. Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., et al. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:16050. doi: 10.1073/pnas.1102999108
76. Mulloy, A., Lang, R., O'Reilly, M., Sigafoos, J., Lancioni, G., & Rispoli, M. (2010). Gluten-free and casein-free diets in the treatment of autism spectrum disorders: A systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 4(3), 328–339.
77. Zimmer, M. H., Hart, L. C., Manning-Courtney, P., Murray, D. S., Bing, N. M., & Summer, S.(2012). Food variety as a predictor of nutritional status among children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42(4), 549–556.
78. Sharp, W. G., Berry, R. C., McCracken, C., Nuhu, N. N., Marvel, E., Saulnier, C. A., et al.(2013). Feeding problems and nutrient intake in children with autism spectrum disorders: A meta-analysis and

- comprehensive review of the literature. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 43, 2159–2173.
79. Bandini, L. G., Anderson, S. E., Curtin, C., Cermak, S., Evans, E. W., Scampini, R., et al. (2010). Food selectivity in children with autism spectrum disorders and typically developing children. *The Journal of Pediatrics*, 157, 259–264.
 80. Herndon, A. C., DiGuseppi, C., Johnson, S. L., Leiferman, J., & Reynolds, A. (2009). Does nutritional intake differ between children with autism spectrum disorders and children with typical development? *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 39(2), 212–222.
 81. Schreck, K. A., & Williams, K. (2006). Food preferences and factors influencing food selectivity for children with autism spectrum disorders. *Research in Developmental Disabilities*, 27(4), 353–363.
 82. Ghalichi, F., Ghaemmaghami, J., Malek, A., & Ostadrahimi, A. (2016). Effect of gluten free diet on gastrointestinal and behavioral indices for children with autism spectrum disorders: A randomized clinical trial. *World Journal of Pediatrics*, 12, 436–442.
 83. Lucarelli, S., Zingoni, A. M., Ferruzzi, F., Giardini, O., Frediani, T., Zingoni, A. M., et al. (1995). Food allergy and infantile autism. *Panminerva Medica*, 37, 137–141.
 84. Geraghty, M. E., Bates-Wall, J., Ratliff-Schaub, K., & Lane, A. E. (2010). Nutritional interventions and therapies in autism: A spectrum of what we know: Part 2. *ICAN Infant Child & Adolescent Nutrition*, 2, 120–133.
 85. Berding, K., & Donovan, S. M. (2018). Diet can impact microbiota composition in children with autism spectrum disorder. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 1–16.
 86. Lindfors, K., Blomqvist, T., Juuti-Uusitalo, K., Stenman, S., Venäläinen, J., Mäki, M., et al. (2008). Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clinical and Experimental Immunology*, 152, 552–558.

87. Kałużna-Czaplińska, J., & Błaszczuk, S. (2012). The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. *Nutrition*, 28, 124–126
88. El-Ansary, A., Bacha, A. B., Bjørklund, G., Al-Orf, N., Bhat, R. S., Moubayed, N., et al. (2018). Probiotic treatment reduces the autistic-like excitation/inhibition imbalance in juvenile hamsters induced by orally administered propionic acid and clindamycin. *Metabolic Brain Disease*, 33, 1155–1164.
89. Parracho, H. M. R. T., Gibson, G. R., Knott, F., Bosscher, D., & Kleerebezem, M. (2010).
90. A double-blind, placebo-controlled, crossover-designed probiotic feeding study in children diagnosed with autistic spectrum disorders. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 5, 69–74.
91. Grimaldi, R., Gibson, G. R., Vulevic, J., Giallourou, N., Castro-Mejía, J. L., Hansen, L. H., et al. (2018). A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome*, 6, 1–13.
92. Pandey Kavita, R., Naik Suresh, R., & Vakil Babu, V. (2015, December). Probiotics, prebiotics and synbiotics – A review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587.
93. Parracho, H. M. R. T., Gibson, G. R., Knott, F., Bosscher, D., Kleerebezem, M., & McCartney, A. L. (2010, May). A double-blind, placebo-controlled, crossover-designed probiotic feeding study in children diagnosed with autistic spectrum disorders. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 5, 69–74.
94. Romeo, M. G., Romeo, D. M., Trovato, L., Oliveri, S., Palermo, F., Cota, F., et al. (2011, January). Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: Incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *Journal of Perinatology*, 31(1), 63–69.
95. de Groot P.F., Frissen M.N., de Clercq N.C., Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes*. 2017; 8:253–267. doi: 10.1080/19490976.2017.1293224

96. Xu MQ, Cao HL, Wang WQ, et al. Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(1): 102–111
97. Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults a systematic review. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2015;313(4):398–408.
98. Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol*. 2003;37(1):42–7.
99. Kang, DW., Adams, J.B., Gregory, A.C. et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* 5, 10 (2017).
100. Kang, DW., Adams, J.B., Coleman, D. et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep* 9, 5821 (2019).
101. Guzman CE, Wood JL, Egidi E, White-Monsant AC, Semenec L, Grommen SVH, Hill-Yardin EL, De Groef B, Franks AE. A pioneer calf foetus microbiome. *Sci Rep*. 2020 Oct 19;10(1):17712. doi: 10.1038/s41598-020-74677-7. PMID: 33077862; PMCID: PMC7572361.
102. Tianyang Zhang, Anna Sidorchuk, Laura Sevilla-Cermeño, Alba Vilaplana-Pérez, Zheng Chang, Henrik Larsson, David Mataix-Cols, Lorena Fernández de la Cruz *JAMA Netw Open*. 2019 Aug; 2(8): e1910236. Published online 2019 Aug 28. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.10236
103. Grehan MJ, Borody TJ, Leis SM, Campbell J, Mitchell H, Wettstein A. Durable alteration of the colonic microbiota by the administration of donor fecal flora. *J Clin Gastroenterol*. 2010 Sep;44(8):551-61. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181e5d06b. PMID: 20716985.

11/4/2021

11/4/2021

DocuSigned by:

Mauricio Callegari Lordello

D61DC78BA61445F...

Data e assinatura do aluno(a)

DocuSigned by:

Thomas Prates Ong

870969642D984D8...

Data e assinatura do orientador(a)