

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 27/08/2023.

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Efeito de Psicobióticos no Transtorno do
Espectro Autista

Ana Luiza Rocha Faria Duque

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Katia Sivieri

Araraquara
2021

Efeito de Psicobióticos no Transtorno do Espectro Autista

Ana Luiza Rocha Faria Duque

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Katia Sivieri

Araraquara
2021

D946e Duque, Ana Luiza Rocha Faria.
Efeito de Psicobióticos no Transtorno do Espectro Autista / Ana Luiza Rocha Faria Duque. – Araraquara: [S.n.], 2021.
99 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciências Nutricionais.

Orientadora: Katia Sivieri.

1. Autismo. 2. Probiótico. 3. Microbiota intestinal. 4. Prebiótico.
5. Eixo microbiota-intestino-cérebro. I. Sivieri, Katia, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004153070P3
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito de Psicobióticos no Transtorno do Espectro Autista

AUTORA: ANA LUIZA ROCHA FARIA DUQUE

ORIENTADORA: KATIA SIVIERI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciências Nutricionais pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KATIA SIVIERI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara

Profa. Dra. MARCIANE MAGNANI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Alimentos / Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. TATIANA COLOMBO PIMENTEL (Participação Virtual)
Eixo de Produção Alimentícia / Instituto Federal do Paraná – Campus Paranavaí

Profa. Dra. SUSANA MARTA ISAY SAAD (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Araraquara, 27 de agosto de 2021

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de Doutorado (Processo nº 2017/01157-1) e de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (Processo nº 2018/26645-1).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora Profa. Dra. Katia Sivieri pela gentileza, paciência, disposição e apoio durante todo o projeto. Sou imensamente grata pelo aprendizado e conhecimento compartilhado durante todos esses anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Costa-Mattioli pela incrível oportunidade de trabalhar junto ao seu laboratório na Baylor College of Medicine. Agradeço por todo carinho e apoio durante a colaboração internacional.

A todos os membros do laboratório, em especial, à Adriana Zavarizi pela prontidão no auxílio de técnicas laboratoriais durante a execução dos experimentos.

A todos os membros do laboratório dos Estados Unidos, em especial, à Laura Ortiz, Martina Sgritta, Sean Dooling, I-Ching Wang e James Okoh pela acolhida no laboratório, oportunidade de aprender diferentes técnicas e contribuições científicas.

À Dra. Maria Angela Adorno do Departamento de Engenharia Ambiental da EESC/USP pelo auxílio nas análises de ácidos graxos de cadeia curta, à Me. Mariana Santoni do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAr/UNESP pelo auxílio nas análises de qPCR e à Dra. Victoria Mesa pelo auxílio nas análises de bioinformática.

Aos professores e funcionários da UNESP e da Baylor College of Medicine pelos importantes ensinamentos e apoio, em especial à Claudia Molina e Marina Grasso.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e por todas as valiosas contribuições.

À FrieslandCampina Ingredients Latin America Ltda, em especial, Marcio Del Bianco, Marília Dorsa e Leonardo Appezato Filho pelo fornecimento do produto Vivinal® GOS utilizado nesse trabalho.

Agradecimentos Pessoais

Aos meus pais, Iara e Venceslau Braz, e irmãos, Tiago, Gustavo e Alex, por todo carinho, incentivo e conselhos dados ao longo da minha vida.

Ao Tiago Izeppi por todo seu amor, parceria e cumplicidade. Agradeço pela felicidade de ter alguém tão especial ao meu lado.

Aos meus queridos amigos Mateus Salgaço, Estela Mesquita, Júlia Valério, Amanda Fernandes, especialmente, Fernanda Freire, Fernanda Bianchi e Larissa Celiberto pelo incentivo e apoio durante os momentos que passamos juntos.

Aos amigos Laura, Emily, Lance, Anu e Oykü pela recepção calorosa nos Estados Unidos.

Aos meus pais, por todo amor e apoio.

Resumo

O eixo microbiota-intestino-cérebro foi recentemente reconhecido como um modulador chave de distúrbios neurológicos, incluindo o Transtorno do Espectro Autista (TEA). Evidências crescentes sugerem que a microbiota intestinal desempenha papel crítico nos sintomas gastrointestinais e déficits comportamentais em indivíduos autistas. Nesse sentido, a administração de psicobióticos (probióticos e prebióticos) tem sido investigada como uma terapia promissora no tratamento do TEA. **Objetivo:** Avaliar o efeito de psicobióticos na composição e metabolismo da microbiota intestinal de crianças com TEA usando o Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH[®]), bem como na microbiota intestinal e déficits comportamentais em um modelo animal de TEA. **Métodos:** Inicialmente, foi avaliada a sobrevivência de cepas probióticas (*Limosilactobacillus* (L.) *reuteri* e *Bifidobacterium* (B.) *longum*) em cultura pura e combinadas com Vivinal[®] GOS sob condições gastrointestinais simuladas e, em seguida, o impacto dos probióticos (L. *reuteri* + B. *longum*), prebiótico (GOS) e simbiótico (L. *reuteri* + B. *longum* + GOS) na microbiota intestinal e no metabolismo de crianças com TEA usando o SEMH[®]. A análise da composição da microbiota intestinal das amostras do SEMH[®] foi realizada por PCR em tempo real e sequenciamento do gene 16S rRNA. O metabolismo microbiano foi determinado pela produção de amônia e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Finalmente, foi investigada se a administração do GOS afetou a composição da microbiota e o comportamento em um modelo genético de autismo (*Cntnap2*^{-/-}). A composição da microbiota dos animais foi avaliada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e os comportamentos associados ao TEA foram determinados por testes de hiperatividade e de comportamentos social e repetitivo. **Resultados:** Os probióticos L. *reuteri* + B. *longum* combinados com GOS apresentaram elevada resistência gastrointestinal, sugerindo que o GOS tem um efeito protetor. De acordo com o estudo no SEMH[®], o tratamento probiótico aumentou a abundância relativa de *Lactobacillus*, enquanto o tratamento prebiótico aumentou a abundância relativa de *Bifidobacterium* e diminuiu a abundância relativa de *Lachnoclostridium*. As mudanças observadas no metabolismo microbiano foram associadas ao aumento das concentrações de AGCC e níveis reduzidos de amônia, particularmente nos tratamentos prebiótico e simbiótico. No estudo em modelo animal, foi observado que o tratamento com GOS não modulou a composição da microbiota. No entanto, melhorou significativamente o comportamento social no modelo animal *Cntnap2*^{-/-}. **Conclusão:** Os tratamentos probiótico, prebiótico e simbiótico resultaram na modulação positiva da microbiota intestinal e atividade metabólica de crianças com TEA usando o SEMH[®]. Além disso, os resultados mostraram que o GOS melhorou os déficits sociais em um modelo animal de autismo. **Palavras-chave:** Autismo; Probiótico; Microbiota intestinal; Prebiótico; Eixo microbiota-intestino-cérebro.

Abstract

The microbiota-gut-brain axis has been recently recognized as a key modulator of neurological disorders, including the Autism Spectrum Disorder (ASD). Increasing evidence suggests that the gut microbiota plays a crucial role in gastrointestinal symptoms and behavior deficits in autistic individuals. Thus, the administration of psychobiotics (probiotics and prebiotics) has been investigated as a promising therapy for the treatment of ASD. **Objective:** To evaluate the effect of psychobiotics on gut microbiota composition and metabolism of children with ASD using the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®), as well on gut microbiota composition and behavior deficits in a mouse model for ASD. **Methods:** Initially, the survival of probiotic strains (*Limosilactobacillus* (*L.*) *reuteri* and *Bifidobacterium* (*B.*) *longum*) in pure culture and combined with Vivinal® GOS under simulated gastrointestinal conditions was evaluated, followed by the impact of probiotics (*L. reuteri* + *B. longum*), prebiotic (GOS) and synbiotic (*L. reuteri* + *B. longum* + GOS) on the gut microbiota and metabolism of children with ASD using the SHIME®. The analysis of the gut microbiota composition of samples from the SHIME® was performed using real-time PCR and 16S rRNA gene sequencing. Microbial metabolism was determined by the production of ammonium and short-chain fatty acids (SCFAs). Finally, it was investigated whether administration of GOS affected microbiota composition and behavior in a genetic model of autism (*Cntnap2*^{-/-}). Gut microbiota composition was evaluated using 16S rRNA gene sequencing and ASD-related behaviors were determined by hyperactivity, and social and repetitive behavior tests. **Results:** The probiotics *L. reuteri* + *B. longum* combined with GOS showed elevated gastrointestinal resistance, suggesting that GOS has a protective effect. According to the SHIME® study, probiotic treatment increased the relative abundance of *Lactobacillus*, while the prebiotic treatment increased the relative abundance of *Bifidobacterium* and decreased the relative abundance of *Lachnospirillum*. The changes observed in microbial metabolism were associated with increased concentrations of SCFAs and reduced ammonium levels, particularly in the prebiotic and synbiotic treatments. In the animal model study, it was observed that treatment with GOS did not modulate the microbiota composition. However, GOS significantly improved social behavior in the *Cntnap2*^{-/-} mice. **Conclusion:** The probiotic, prebiotic, and synbiotic treatments resulted in a positive modulation of the gut microbiota and metabolic activity of children with ASD using the SHIME®. In addition, the results showed that GOS improved social deficits in a mouse model of autism.

Keywords: Autism; Probiotic; Gut microbiota; Prebiotic; Microbiota-gut-brain axis.

Lista de Tabelas

	Página
Capítulo 1.	
Table1. Treatments exposed to simulated gastrointestinal conditions.	55
Table 2. Primer sequences used in quantitative real-time PCR.	55
Table 3. Population (log CFU/mL) and survival rate (%) of <i>B. longum</i> and <i>L. reuteri</i> alone, mixed and combined with GOS under simulated gastrointestinal conditions.	56

Lista de Figuras

Página

Introdução

Figura 1. Fatores que influenciam a microbiota intestinal. 14

Figura 2. Mecanismos de comunicação do eixo microbiota-intestino-cérebro. 15

Capítulo 1.

Figure 1. Schematic representation of the experimental design used in the short-term SHIME® run. 56

Figure 2. Schematic representation of the experimental design used in the long-term SHIME® run. 57

Figure 3. Relative abundance (ΔC_t) of bacterial groups in the microbiota of child with autism spectrum disorder (ASD) using the SHIME® model over the course of synbiotic incubation periods. 57

Figure 4. (A) Short-chain fatty acid and (B) ammonium concentrations in the microbiota of child with autism spectrum disorder (ASD) using the SHIME® model over the course of synbiotic incubation periods. 58

Figure 5. Relative abundance of different phyla in the microbiota of children with autism spectrum disorder (ASD) using the SHIME® model over the course of the probiotic, prebiotic, and synbiotic treatments. 58

Figure 6. Relative abundance of different families in the microbiota of children with autism spectrum disorder (ASD) using the SHIME® model over the course of the probiotic, prebiotic, and synbiotic treatments. 59

Figure 7. Relative abundance of bacterial genera in the microbiota of children with autism spectrum disorder (ASD) using the SHIME® model over the course of the probiotic, prebiotic, and synbiotic treatments. 60

Figure 8. Alpha diversity metrics of the microbiota of children with autism spectrum disorder (ASD) using the SHIME® model. 61

Figure 9. Principal coordinates analysis (PCoA) of bacterial beta diversity based on (A) Bray-Curtis dissimilarity, and (B) weighted and (C) unweighted UniFrac distances of the microbiota of children with autism spectrum disorder (ASD). 62

Figure 10. Short-chain fatty acid and ammonium concentrations in the ascending (AC), transverse (TC), and descending (DC) colons inoculated with fecal microbiota from children with autism spectrum disorder (ASD) over the course of the probiotic, prebiotic, and synbiotic treatments. 63

Figure 11. Correlation analysis between different bacterial genera and metabolite production in the samples obtained from the SHIME® model. 64

Capítulo 2.

Figure 1. Scheme of the experimental design. 86

Figure 2. (A) PCoA of weighted UniFrac distances from the 16S rRNA gene sequencing dataset from feces of WT, *Cntnap2*^{-/-} + vehicle and *Cntnap2*^{-/-} + GOS mice. (B) PCoA of unweighted UniFrac distances from the 16S rRNA gene sequencing dataset from feces of WT, *Cntnap2*^{-/-} + vehicle and *Cntnap2*^{-/-} + GOS samples. 86

Figure 3. Alpha-diversity metrics. 87

Figure 4. Relative abundance of the top 5 most abundant phyla from WT and *Cntnap2*^{-/-} mice. 87

Figura 5. Anxiety-like and locomotor behavior in the open field test. 88

Figure 6. (A) Three-chamber social test for sociability and social novelty. (B) Reciprocal social interaction test. 88

Figure 7. (A) Self-grooming behavior test. (B) T-maze spontaneous alternation task. (C) Nest-building test. 89

Sumário

	Página
Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	x
 Introdução	 13
 Capítulo 1. Effect of probiotic, prebiotic, and synbiotic on the gut microbiota of autistic children using an <i>in vitro</i> gut microbiome model	 23
Abstract	25
Introduction	26
Material and methods	29
Results	35
Discussion	40
Conclusions	44
References	46
 Capítulo 2. Impact of prebiotic on gut microbiota and social behaviors in a mouse model of autism spectrum disorder	 65
Abstract	67
Introduction	68
Material and methods	69
Results	75
Discussion	78
Conclusion	80
References	81
 Considerações Finais	 90
Referências	92

Introdução

O trato gastrointestinal humano abriga uma comunidade dinâmica e complexa de microrganismos, conhecida como microbiota intestinal, que coevoluiu com o hospedeiro para desenvolver uma relação simbiótica (1). A colonização da microbiota ocorre nos primeiros anos de vida e gradualmente se desenvolve em um ecossistema diverso ao longo da vida adulta. O desenvolvimento e a maturação da microbiota intestinal são influenciados por diferentes fatores que variam desde o tipo de parto (cesariana versus vaginal) ao uso de antibióticos, genética do hospedeiro e dieta (2,3) (Figura 1). Estudos têm revelado que a microbiota intestinal desempenha papel chave em várias funções fisiológicas do hospedeiro, incluindo a homeostase metabólica e nutricional, a maturação e função do sistema imunológico e a manutenção da integridade da barreira intestinal (5-7). Além disso, foi demonstrado que a microbiota intestinal tem um impacto significativo extra intestinal, como na neurofisiologia e no comportamento (8,9).

Evidências crescentes sugerem uma interação entre a microbiota intestinal e o sistema nervoso central (SNC) conhecida como eixo microbiota-intestino-cérebro (10-13). A comunicação ao longo do eixo microbiota-intestino-cérebro descreve como os sinais a partir do cérebro podem influenciar atividades motoras, sensoriais e secretoras do trato gastrointestinal, e, por sua vez, como as mensagens viscerais do trato gastrointestinal podem influenciar a função cerebral (14). Esta comunicação bidirecional atua, principalmente, por meio de mecanismos endócrinos, imunes e neurais que envolvem o SNC e o sistema nervoso entérico (SNE) (12,15). No entanto, os mecanismos precisos ainda não estão completamente elucidados. As vias de comunicação entre a microbiota e o cérebro incluem a ativação do nervo vago, sistema imunológico, eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o metabolismo do triptofano e a

produção de neurotransmissores e metabólitos microbianos que influenciam direta e indiretamente o cérebro (Figura 2).

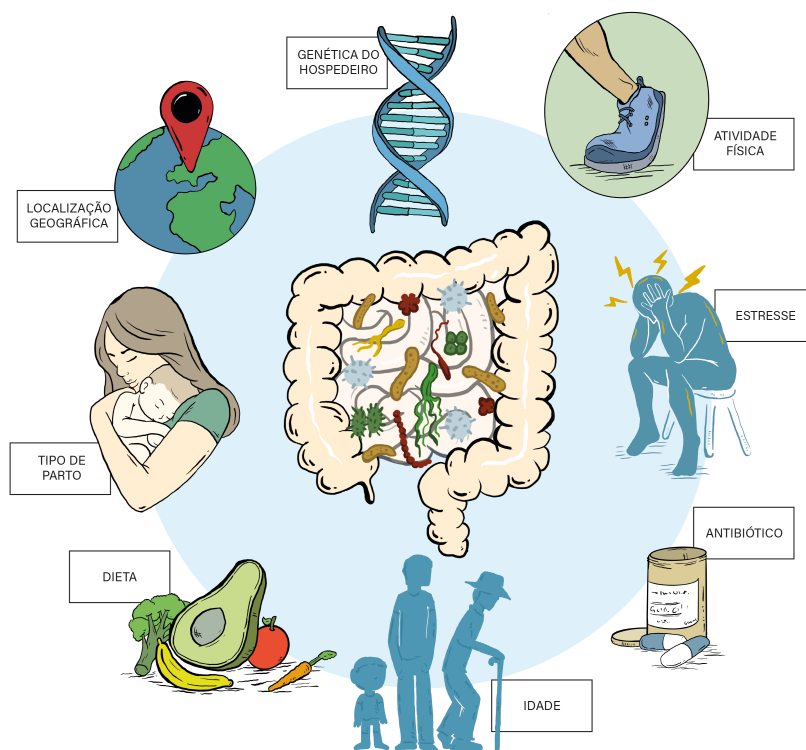


Figura 1. Fatores que influenciam a microbiota intestinal.

Fonte: Adaptado de Long-Smith et al. (4).

O nervo vago representa a principal via neural que conecta o intestino e o cérebro. As fibras do nervo vago inervam as camadas musculares e mucosas do trato gastrointestinal, detectam sinais sensoriais e, em seguida, retransmitem esses sinais para o SNC (16). A transmissão de sinais microbianos ocorre por meio da mediação de células enteroendócrinas ou pela ativação de mecanorreceptores ou quimiorreceptores no epitélio intestinal, desencadeados por estímulos químicos como hormônios, neurotransmissores e metabólitos produzidos pela microbiota intestinal (17,18).

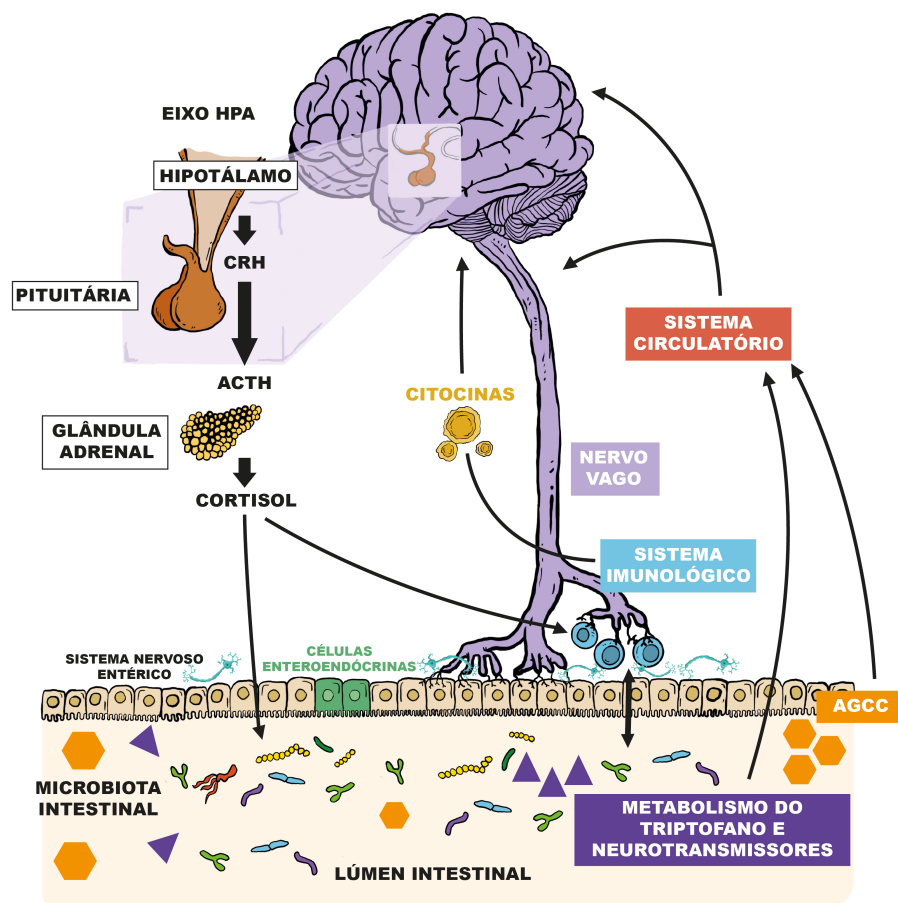


Figura 2. Mecanismos de comunicação do eixo microbiota-intestino-cérebro.

O estresse pode ativar a resposta do eixo HPA que envolve a síntese e liberação de cortisol. O cortisol regula as respostas de sinalização neuroimune que, por sua vez, afetam a integridade da barreira intestinal. Hormônios do estresse, mediadores imunológicos e neurotransmissores do SNC podem ativar células neuronais do SNE e das vias aferentes do nervo vago, e alterar a composição da microbiota intestinal (19).

A microbiota intestinal produz vários metabólitos e neurotransmissores, alguns dos quais estão envolvidos na fisiologia do cérebro e comportamento. Estudos demonstraram que certas bactérias são capazes de produzir neurotransmissores como

noradrenalina, dopamina e ácido gama-aminobutírico (GABA), o que implica os microrganismos como mediadores de moléculas de sinalização usadas pelo sistema nervoso (15,20-22). Também foi demonstrado que a microbiota intestinal influencia indiretamente a neurotransmissão serotoninérgica ao regular a disponibilidade do triptofano, o precursor da serotonina (23,24). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principais metabólitos produzidos pela fermentação bacteriana de fibras dietéticas no cólon, podem influenciar a fisiologia do cérebro e comportamento através da ligação e ativação dos receptores de ácidos graxos livres (FFARs) que são expressos no nervo vago, bem como participar da produção de neurotransmissores no cérebro, regulando a expressão de enzimas envolvidas em sua biossíntese (25,26).

O sistema imunológico é um importante mediador da interação entre a microbiota intestinal e o cérebro por meio da produção de citocinas. As citocinas podem ser produzidas por células do sistema imunológico ou acessar o SNC por meio de transporte direto através da barreira hematoencefálica (BHE). Infecções, doenças autoimunes e lesões podem alterar a integridade da BHE, aumentando assim a acessibilidade do cérebro a produtos microbianos no sistema circulatório (27). Além disso, a ativação central de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) por produtos bacterianos, como peptidoglicano (PGN) e lipopolissacarídeo (LPS), pode afetar diretamente o desenvolvimento do cérebro e o comportamento (28,29).

O eixo microbiota-intestino-cérebro foi reconhecido como um modulador chave de distúrbios neurológicos, incluindo o transtorno do espectro autista (TEA) (30-32). O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento de manifestação precoce caracterizado por comprometimentos na comunicação e nas interações sociais e pela presença de padrões restritos e repetitivos de comportamento (33). Estima-se que o TEA afeta uma em cada 54 crianças nos Estados Unidos com maior prevalência em meninos (34).

Evidências sugerem que fatores genéticos e ambientais estão associados com a etiologia do TEA. As comunidades bacterianas intestinais situam-se na interseção do hospedeiro e do meio ambiente e podem influenciar diretamente a saúde humana. A disbiose da microbiota intestinal está associada com alterações na composição e atividade metabólica das bactérias intestinais, resultando na redução de bactérias comensais e/ou no aumento da abundância de bactérias patogênicas, que podem estar associados a manifestações neurocomportamentais e sintomas gastrointestinais em indivíduos autistas (31,35-37).

Alterações na composição da microbiota intestinal têm sido relatadas em indivíduos com TEA, entretanto, é importante ressaltar que há pouco consenso sobre uma assinatura precisa da microbiota para o TEA. Tomova et al. (38) mostraram redução da razão *Bacteroidetes/Firmicutes* em crianças autistas, enquanto Zhang et al. (39) observaram resultado oposto. Gêneros como *Desulfovibrio* e *Clostridium*, frequentemente associados a patologias, foram encontrados em maior abundância na microbiota de crianças com TEA em comparação a crianças neurotípicas (40,41). Por outro lado, os gêneros *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Veillonella* foram encontrados em menor abundância na microbiota de crianças autistas (35,42-44).

Sintomas gastrointestinais como dor abdominal, diarreia, constipação e flatulência foram caracterizados como comorbidades comuns em indivíduos com TEA (45,46). Curiosamente, foi relatado que os sintomas gastrointestinais estão fortemente associados à gravidade do TEA (47,48). De fato, crianças autistas que apresentam problemas gastrointestinais muitas vezes exibem comportamentos significativamente mais elevados de irritabilidade, ansiedade e isolamento social (49).

Nesse sentido, a modulação da microbiota intestinal é uma estratégia potencialmente interessante que pode alterar comportamentos influenciados pelo SNC

(9,50). Assim, a administração de psicobióticos vem sendo apontada como uma promissora abordagem terapêutica na redução de sintomas gastrointestinais e comportamentais associados ao TEA (51-53). Os psicobióticos foram inicialmente definidos como probióticos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, produzem efeitos psiquiátricos positivos na psicopatologia (54). Sarkar et al. (55) propuseram a inclusão de prebióticos na definição de psicobióticos, uma vez que os prebióticos produzem alterações específicas na composição e atividade microbiana do cólon, como o crescimento de bactérias comensais. Os psicobióticos podem atuar na regulação dos neurotransmissores e proteínas, incluindo GABA, serotonina e glutamato que desempenham papéis importantes no controle do comportamento, funções cognitivas, aprendizagem e processos de memória (56).

Especificamente, os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (57). As bactérias probióticas mais frequentemente estudadas são *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp.. Os efeitos benéficos atribuídos aos probióticos incluem a modulação da composição da microbiota intestinal, inibição de potenciais patógenos às células epiteliais do cólon, estimulação do sistema imunológico e manutenção da função da barreira epitelial intestinal (57-59). Os probióticos também atuam na regulação do eixo microbiota-intestino-cérebro. A administração de *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 mostrou redução de comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão em camundongos. Além disso, esse microrganismo alterou a expressão de receptores GABA no cérebro (60). Bercik et al. (61) mostraram que o *Bifidobacterium longum* NCC3001 melhorou o comportamento semelhante à ansiedade em camundongos com colite infecciosa.

A administração de probióticos também tem sido investigada como estratégia

para melhorar os sintomas relacionados ao TEA. Hsiao et al. (62) demonstraram que a administração de *Bacteroides fragilis* em modelo animal de ativação imune materna, caracterizado por exibir comportamentos semelhantes ao autismo, melhorou a integridade da barreira intestinal e reduziu significativamente déficits comportamentais como ansiedade e comportamento repetitivo. Além disso, foi demonstrado que a administração do probiótico *Lactobacillus reuteri* reverteu déficits sociais associados ao TEA e restaurou níveis de ocitocina - hormônio que influencia o comportamento social - em modelo animal (63). Em um estudo clínico, a suplementação com probióticos por 4 meses, compreendendo cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, normalizou a razão *Bacteroidetes/Firmicutes* e as contagens de *Desulfovibrio* spp. e *Bifidobacterium* spp. na microbiota fecal de crianças autistas (38). Shaaban et al. (51) mostraram que crianças com TEA tratadas por 3 meses com um coquetel probiótico (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*) apresentaram melhora nos sintomas comportamentais e gastrointestinais associados ao TEA. Embora essas observações clínicas sejam promissoras, devem ser interpretadas com cautela, uma vez que estudos clínicos são atualmente limitados.

Os prebióticos, por sua vez, são considerados substratos utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem benefícios à saúde (64). Inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS) são os prebióticos mais documentados na saúde humana (65). Os principais efeitos dos prebióticos estão relacionados com o impacto na composição e atividade da microbiota intestinal, estimulando o crescimento de bactérias comensais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, bem como a produção de AGCC (66).

Estudos também mostram que os prebióticos podem apresentar efeitos neuroendócrinos. Os prebióticos FOS e GOS mostraram efeito ansiolítico e

antidepressivo em camundongos com estresse crônico que foi associado a alterações na composição da microbiota intestinal e produção de metabólitos (67). Schmidt et al. (68) demonstraram que a intervenção prebiótica com Bimuno® (B-GOS®) por três semanas diminuiu os níveis de cortisol salivar em indivíduos saudáveis, sugerindo que a administração de prebióticos pode modular o eixo HPA. O efeito da intervenção prebiótica também foi investigada no contexto do TEA. O prebiótico B-GOS® teve um impacto positivo na composição e no perfil metabólico da microbiota intestinal usando um modelo de fermentação *in vitro* inoculado com amostras fecais de crianças autistas (69). Posteriormente, esses pesquisadores mostraram que a combinação de uma dieta livre de glúten e caseína com o B-GOS® resultou na melhora do comportamento social em crianças com TEA (53).

Já os simbióticos são definidos como uma “mistura compreendendo microrganismos vivos e substrato(s) utilizado(s) seletivamente por microrganismos hospedeiros que confere benefício à saúde do hospedeiro” (70). Em um estudo duplo-cego, controlado por placebo, Wang et al. (71) mostraram que a intervenção com probióticos (*Bifidobacterium infantis* Bi-26, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Bifidobacterium lactis* BL-04 e *Lactobacillus paracasei* LPC-37) + FOS melhorou os sintomas do TEA em crianças autistas e foi eficaz na modulação da composição da microbiota intestinal e na produção de AGCC. Apesar dos resultados desse estudo serem promissores, o efeito da administração de simbióticos nas disfunções gastrointestinais e comportamentais do TEA tem sido pouco explorado.

Recentemente, o transplante da microbiota fecal (TMF) também vem sendo investigado como uma terapia potencial para indivíduos com TEA. Em um estudo clínico, 18 crianças com TEA tratadas com TMF durante 8 semanas apresentaram melhora nos sintomas gastrointestinais e comportamentais associados ao autismo (72). Além disso,

mudanças importantes na microbiota intestinal dos mesmos participantes, incluindo aumentos significativos na diversidade bacteriana e abundância relativa de *Bifidobacterium* e *Prevotella*, foram mantidas no estudo de acompanhamento de 2 anos após a interrupção do tratamento com TMF (73). No entanto, é importante reconhecer que os estudos apresentaram limitações quanto ao tamanho da amostra e desenho experimental. Embora a replicação e validação desses achados em uma população mais ampla e heterogênea sejam necessárias, esses estudos forneceram evidências preliminares promissoras para demonstrar que a microbiota pode de fato ser uma abordagem viável como estratégia de tratamento para o TEA.

Os estudos da microbiota intestinal podem ser realizados utilizando modelos *in vitro* ou *in vivo*. Os modelos de fermentação *in vitro* permitem estudar de forma representativa a microbiota intestinal humana sob condições ambientais controladas. Além disso, podem monitorar a composição e atividade microbiana, fornecendo informações sobre as etapas do processo de fermentação nas diferentes regiões consecutivas do cólon (74,75). Essa abordagem permite explorar a influência de uma ampla variedade de fatores sobre a microbiota intestinal, como componentes dietéticos (probióticos e prebióticos), patógenos microbianos, produtos farmacêuticos e substâncias tóxicas (76). Nos últimos anos, nosso grupo vem desenvolvendo várias pesquisas utilizando o Simulador do Ecossistema Microbiano Humano (SEMH®) como ferramenta de avaliação da microbiota intestinal, incluindo o impacto do *Enterococcus faecium* CRL 183 (77) e da pectina cítrica combinada com *Bifidobacterium longum* BB-46 (78) na microbiota intestinal, bem como o efeito prebiótico do FOS (79), bebida “multifuncional” de leite cabra fermentado (80) e sorvete probiótico (81) na microbiota intestinal.

Estudos *in vivo*, em animais ou humanos, constituem uma abordagem

representativa para investigar as interações entre a microbiota e o hospedeiro. Os modelos animais são importantes ferramentas em pesquisas relacionadas ao TEA, uma vez que podem exibir endofenótipos neuropatológicos e comportamentais semelhantes ao autismo (82). Vários modelos animais têm sido utilizados para explorar as múltiplas vias de comunicação entre a microbiota intestinal e o cérebro, e mostrar como a sinalização química, neuronal e imune podem influenciar fenótipos semelhantes ao TEA (62,63,83,84). Sgritta et al. (85), por exemplo, mostraram que o *Lactobacillus reuteri* reverteu déficits sociais em vários modelos animais de TEA, incluindo modelos genéticos, ambientais e idiopáticos. Esses achados apoiam a ideia de que terapias microbianas podem melhorar endofenótipos específicos associados ao TEA.

Em conjunto, essas evidências destacam que estratégias baseadas na microbiota estão emergindo como promissoras abordagens terapêuticas na redução de sintomas associados ao TEA. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de psicobióticos na composição e metabolismo da microbiota intestinal de crianças com TEA usando o SEMH[®], bem como na microbiota intestinal e déficits comportamentais em um modelo animal de TEA.

Considerações Finais

O número crescente de crianças autistas vem encorajando os pesquisadores a desenvolverem novas estratégias para prevenir e tratar o TEA. Evidências do envolvimento da microbiota intestinal em distúrbios neurológicos fornecem novas possibilidades para o desenvolvimento de terapias promissoras no tratamento de sintomas comportamentais associados ao TEA. Nesse sentido, estudos com o objetivo de investigar os efeitos de pro- e prebióticos na composição e metabolismo da microbiota intestinal e sua relação com diversas doenças neurológicas, incluindo o TEA, têm se tornado mais frequentes.

Nosso estudo mostrou que os probióticos *L. reuteri* + *B. longum* combinados com GOS apresentaram elevada taxa de sobrevivência quando submetidos às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, evidenciando um efeito protetor do prebiótico GOS. Essa etapa do estudo foi de extrema importância, uma vez que a capacidade de sobrevivência às condições adversas do trato gastrointestinal é um dos principais requisitos para que os probióticos exerçam seus efeitos benéficos no cólon.

A combinação de *L. reuteri* + *B. longum* + GOS foi então selecionada para ser avaliada em estudos de curta e longa duração utilizando o SEMH[®], um modelo colônico dinâmico *in vitro* que simula as diferentes partes do trato gastrointestinal humano. Os estudos no SEMH[®] permitiram avaliar os efeitos potenciais dos tratamentos com pro-, pre- e simbióticos sobre a composição e os metabólitos da microbiota intestinal de crianças com TEA. Os tratamentos avaliados mostraram resultados positivos e promissores na modulação da microbiota intestinal e metabólitos microbianos de crianças com TEA, estimulando a produção de AGCC e diminuindo os níveis de amônia. Os tratamentos pre- e simbiótico, especificamente, mostraram resultados similares e mais evidentes. Assim, hipotetizamos que o GOS, substrato utilizado seletivamente

pelos microrganismos hospedeiros que, por sua vez, produzem AGCC, poderia representar uma melhor estratégia para modular positivamente a microbiota, uma vez que ele foi o ponto em comum entre os tratamentos. Portanto, os resultados desta etapa do estudo foram a premissa para uma investigação mais aprofundada sobre a possível influência de prebióticos no TEA.

Além disso, visto que a administração de prebióticos, como uma possível estratégia no tratamento de distúrbios neurológicos, não tem sido amplamente explorada, investigamos se a administração de GOS afetou o comportamento e a composição da microbiota em um modelo animal de TEA. Observamos que o GOS melhorou significativamente os déficits sociais, no entanto, não teve efeito na modulação da microbiota.

Mais estudos são necessários para avaliar e compreender os efeitos de pro- e prebióticos, como potencial abordagem terapêutica, em diferentes modelos animais de distúrbios neurológicos levando em consideração a complexidade do metagenoma para entender a etiologia de diferentes comportamentos associados ao TEA. Além disso, futuros ensaios clínicos devem também investigar as hipóteses pelas quais a microbiota intestinal interfere nos comportamentos associados ao TEA, através da exploração dos mecanismos envolvidos na comunicação do eixo microbiota-intestino-cérebro. Tais investigações são necessárias não apenas para a reprodutibilidade das descobertas utilizando diferentes abordagens, como sistemas *in vitro*, modelos animais e ensaios clínicos, mas também para demonstrar o potencial terapêutico da modulação da microbiota intestinal nos distúrbios neurológicos como o TEA. Por fim, descobertas adicionais sobre o papel da microbiota intestinal no TEA podem auxiliar no desenvolvimento de novas terapias que beneficiam a saúde e o bem-estar geral de indivíduos autistas.

Referências

1. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J*. 2017;474(11):1823-1836.
2. Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. The gut microbiota in the first decade of life. *Trends Microbiol*. 2019;27(12):997-1010.
3. Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nat Med*. 2018;24(4):392-400.
4. Long-Smith C, O'Riordan KJ, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota-gut-brain axis: New therapeutic opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2020;60:477-502.
5. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018;57(1):1-24. 5
6. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*. 2020;30:492-506.
7. Massier L, Blüher M, Kovacs P, Chakaroun RM. Impaired intestinal barrier and tissue bacteria: Pathomechanisms for metabolic diseases. *Front in Endocrinol*. 2021;12:1467.
8. Sampson TR, Mazmanian SK. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe*. 2015;17:565-576.
9. Vuong HE, Yano JM, Fung TC, Hsiao EY. The microbiome and host behavior. *Annu Rev Neurosci*. 2017;40:21-49.
10. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosc*. 2012;13(10):701-712.
11. 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.
12. Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan C, Sandhu KV, Bastiaanssen T, Boehme M, et al. The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev*. 2019;99(4):1877-2013.
13. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest*. 2015;125(3):926-938.
14. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol*. 2011;2(94):1-15.
15. Sherwin E, Bordenstein SR, Quinn JL, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and the social brain. *Science*. 2019;366(6465):eaar2016.
16. Wang FB, Powley TL. Vagal innervation of intestines: Afferent pathways mapped with new en bloc horseradish peroxidase adaptation. *Cell Tissue Res*. 2007;329:221-230.

17. Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Front. Neurosci.* 2018;12:49.
18. Powley TL, Spaulding RA, Haglof SA. Vagal afferent innervation of the proximal gastrointestinal tract mucosa: Chemoreceptor and mechanoreceptor architecture. *J. Comp. Neurol.* 2011;519:644-660.
19. Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19:241-255.
20. Strandwitz P, Kim KH, Terekhova D, Liu JK, Sharma A, Levering J, et al. GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat Microbiol.* 2019;4:396-403.
21. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 2018;1693:128-133.
22. Huang F, Wu X. Brain neurotransmitter modulation by gut microbiota in anxiety and depression. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:649103.
23. Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, et al. The microbiome–gut–brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol. Psychiatry.* 2013;18:666-673.
24. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe.* 2018;23(6):716-724.
25. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front Endocrinol.* 2020;11:25.
26. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16:461-478.
27. Powell N, MacDonald TT. Recent advances in gut immunology. *Parasite Immunol.* 2017;39(6):e12430.
28. Wolf AJ, Underhill DM. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(4):243-254.
29. Gonzalez-Santana A, Heitz RD. Bacterial peptidoglycans from microbiota in neurodevelopment and behavior. *Trends Mol Med.* 2020;26(8):729-743.
30. De Theije CG, Wu J, Da Silva SL, Kamphuis PJ, Garssen J, Korte SM, et al. Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol.* 2011;668:70-80.
31. Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. Gut microbes and the brain: Paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci.* 2014;34(46):15490-15496.
32. Lasheras I, Seral P, Latorre E, Barroso E, Gracia-García P, Santabàrbara J. Microbiota and gut-brain axis dysfunction in autism spectrum disorder: Evidence for functional gastrointestinal disorders. *Asian J Psychiatr.* 2020;47:101874.
33. American Psychiatric Association – APA. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5). 5th ed. Washington DC: Am Psyc Assoc. 2013

34. Maenner MJ, Shaw KA, Baio J, Washington A, Patrick M, DiRienzo M, 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.
35. Kang D-W, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, et al. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PloS One*. 2013;8:1-14.
36. Levy M, Kolodziejczyk A, Thaïss C, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017;17: 219-232.
37. Srikantha P, Mohajeri MH. The possible role of the microbiota-gut-brain-axis in autism spectrum disorder. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2115.
38. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, Ostatnikova D. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiol Behav*. 2015;138:179-87.
39. Zhang M, Ma W, Zhang J, He Y, Wang J. Analysis of gut microbiota profiles and microbe-disease associations in children with autism spectrum disorders in China. *Sci Rep*. 2018;8:13981.
40. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*. 2010;16:444-453.
41. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(11):6459-6465.
42. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazzanetti DI, et al. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One*. 2013;8(10):e76993.
43. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6718-6721.
44. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. 2017;5(1):24.
45. McElhanon BO, McCracken C, Karpen S, Sharp WG. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A meta-analysis. *Pediatrics*. 2014;133:872-883.
46. Holingue C, Newill C, Lee LC, Pasricha PJ, Daniele Fallin M. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence. *Autism Res*. 2018;11(1):24-36.
47. 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;11:22.
48. Hsiao EY. Gastrointestinal issues in autism spectrum disorder. *Harv Rev Psychiatry*. 2014;22:104-111.

49. Nikolov RN, Bearss KE, Lettinga J, Erickson C, Rodowski M, Aman MG, et al. Gastrointestinal symptoms in a sample of children with pervasive developmental disorders. *J Autism Child Schizophr.* 2009;39(3):405-413.
50. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The central nervous system and the gut microbiome. *Cell.* 2016;167(4):915-932.
51. Shaaban SY, El Gendy YG, Mehanna NS, El-Senousy WM, El-Feki HSA, Saad K, et al. The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutr Neurosci.* 2018;21:676-681.
52. Santocchi E, Guiducci L, Prosperi M, Calderoni S, Gaggini M, Apicella F, et al. Effects of probiotic supplementation on gastrointestinal, sensory and core symptoms in autism spectrum disorders: A randomized controlled trial. *Front Psychiatry.* 2020;11:550-593.
53. Grimaldi R, Gibson GR, Vulevic, J, Giallourou N, Castro-Mejía JL, Hansen LH, et al. A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome.* 2018;6:133.
54. Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry.* 2013;74:720-726.
55. Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, Burnet PWJ. Psychobiotics and the manipulation of bacteria–gut–brain signals. *Trends Neurosci.* 2016;39(11):763-781.
56. Cheng LH, Liu YW, Wu CC, Wang S, Tsai YC. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *J Food Drug Anal.* 2019;27(3):632-648.
57. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11:506-514.
58. Yan F, Polk DB. Probiotics and probiotic-derived functional factors-mechanistic insights into applications for intestinal homeostasis. *Front Immunol.* 2020;11:1428.
59. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(9):503-14.
60. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *PNAS.* 2011;108(38):16050-16055.
61. Bercik P, Park AJ, Sinclair D, Khoshdel A, Lu J, Huang X, et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut–brain communication. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(12):1132-1139.
62. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell.* 2013;155(7):1451-63.

63. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. *Cell*. 2016;165:1762-1775.
64. Gibson G, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salmien SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:491-502.
65. Rastall RA, Gibson GR. Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;32:42-46.
66. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *Br J Nutr*. 2010;104(2):61-63.
67. Burokas A, Arboleya S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G. Targeting the microbiota-gut-brain axis: Prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. *Biol Psychiatry*. 2017;82(7):472-487.
68. Schmidt K, Cowen PJ, Harmer CJ, Tzortzis G, Errington S, Burnet PW. Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology*. 2015;232(10):1793-1801.
69. Grimaldi R, Cela D, Swann JR, Vulevic J, Gibson GR, Tzortzis G, et al. In vitro fermentation of B-GOS: Impact on faecal bacterial populations and metabolic activity in autistic and non-autistic children. *FEMS Microbiol Ecol*. 2017;93(2):fiw233.
70. Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, Reimer RA, Reid G, Verbeke K, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(11):687-701.
71. Wang Y, Li N, Yang J-J, Zhao D-M, Chen B, Zhang G-Q, 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. *Pharmacol Res*. 2020;157:104784.
72. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*. 2017;5(1):10.
73. Kang DW, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-Means S, et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Reports*. 2019;9(1):5821.
74. Venema K, Abbeele PVD. Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013;27:115-126.
75. Pham VT, Mohajeri MH. The application of in vitro human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics. *Benefic Microbes*. 2018;9(5):725-742.
76. Nissen L, Casciano F, Gianotti A. Intestinal fermentation in vitro models to study food-induced gut microbiota shift: An updated review. *FEMS Microbiol Lett*. 2020;367(12):fnaa097.

77. Sivieri K, Bianchi F, Tallarico MA, Rossi, EA. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183. *Funct Foods Health Dis*. 2011;10:389-402.
78. Bianchi F, Larsen N, de Mello Tieghi T, Adorno M, Kot W, Saad S, et al. Modulation of gut microbiota from obese individuals by in vitro fermentation of citrus pectin in combination with *Bifidobacterium longum* BB-46. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(20):8827-8840.
79. Sivieri K, Morales MLV, Saad SMI, Adorno MAT, Sakamoto IK, Rossi EA. Prebiotic effect of fructooligosaccharide in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME® Model). *Journal of Medicinal Food*. 2014;17(8):894-901.
80. Freire FC, Adorno MAT, Sakamoto IK, Antoniassi R, Chaves ACS, Santos KMO, et al. Impact of multi-functional fermented goat milk beverage on gut microbiota in a dynamic colon model. *Food Res Int*. 2017;99:315-327.
81. Rodrigues VDC, Duque ALRF, Fino LC, Simabuco FM, Sartoratto A, Cabral L, et al. Modulation of the intestinal microbiota and the metabolites produced by the administration of ice cream and a dietary supplement containing the same probiotics. *Br J Nutr*. 2020;6:1-12.
82. Gadad BS, Hewitson L, Young KA, German DC. Neuropathology and animal models of autism: Genetic and environmental factors. *Autism Res Treat*. 2013;2013:731935.
83. Tabouy L, Getselter D, Ziv O, Karpuz M, Tabouy T, Lukic I, et al. Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2018;73:310-319.
84. Chao OY, Yunger R, Yang YM. Behavioral assessments of BTBR T+Itpr3tf/J mice by tests of object attention and elevated open platform: Implications for an animal model of psychiatric comorbidity in autism. *Behav Brain Res*. 2018;347:140-147.
85. Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA, et al. Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorder. *Neuron*. 2019;101(2):246-259.