



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
LETÍCIA VENTURA

**EFEITOS DO TRANSPLANTE DE MICROBIOTA INTESTINAL PRECOCE EM
PARÂMETROS COGNITIVOS EM UM MODELO PRÉ CLÍNICO DE AUTISMO**

Palhoça

2022

LETÍCIA VENTURA

**EFEITOS DO TRANSPLANTE DE MICROBIOTA INTESTINAL PRECOCE EM
PARÂMETROS COGNITIVOS EM UM MODELO PRÉ CLÍNICO DE AUTISMO**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor (a) em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Profa. Anna Paula Piovezan, Dra.

Palhoça

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - DOUTORADO

Título da Tese

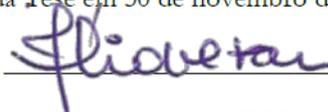
Efeitos do Transplante de Microbiota Intestinal Precoce em Parâmetros Cognitivos em um Modelo Pré Clínico de Autismo

LETÍCIA VENTURA

AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Tese em 30 de novembro de 2022.

Doutora Anna Paula Piovezan (Orientador)



Doutor Eduardo Cargnin Ferreira (Avaliador externo - IFSC) – *presente por videoconferência,*

Doutora Lia Karina Volpato (Avaliador externo – Hospital Regional de São José) – *presente por videoconferência,*

Doutora Josiane Somariva Prophiro (Avaliador interno – PPGCS) – *presente por videoconferência,*

Doutor Rafael Mariano de Bitencourt (Avaliador interno – PPGCS) – *presente por videoconferência,*

Doutora Gislaine Tezza Rezin (Suplente interno – PPGCS) – *presente por videoconferência.*



Professora Doutora Gislaine Tezza Rezin

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina, Sede, Reitoria - Av. José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000

• Unisul Região Sul

- Campus Tubarão - Avenida José Acácio Moreira, 787, Bairro Dehon, Caixa Postal 370 - 88704-900, Tubarão, SC - Fone 48 3621.3000

- Campus Araranguá - Rodovia Governador Jorge Lacerda, 3201, Bairro Urussanguinha - 88905-355, Araranguá, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3521-3000

- Campus Braço do Norte - Rodovia SC 370, 1023, Rio Bonito - 88750-000, Braço do Norte, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3925

- Campus Içara - Rua Linha Três Ribeirões, Loteamento Centenário, 250, Bairro Liri - 88820-000, Içara, SC - Fone 0800 970 7000 - 48 3621-3460

• Unisul Região Grande Florianópolis

- Campus Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25, Cidade Universitária Pedra Branca, 88137-270, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1000

- Campus Florianópolis - Rua Dib Mussi, 366, Centro - 88015-110, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000

- Rua Trajano, 219, Centro - 88010-010, Florianópolis, SC - Fone 48 3279.1000

• Campus Unisul Digital - Av. Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - 88137-900, Palhoça, SC - Fone 48 3279.1200

V57 Ventura, Leticia, 1994 -
Efeitos do transplante de microbiota intestinal precoce em
parâmetros cognitivos em um modelo pré clínico de autismo / Leticia
Ventura. – 2022.
60 f. : il. color. ; 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-
graduação em Ciências da Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Anna Paula Piovezan

1. Autismo. 2. Microbioma gastrointestinal. 3. Disbiose. 4.
Transplante de Microbiota Fecal. I. Piovezan, Anna Paula. II.
Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.8982

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

RESUMO

Introdução: A exposição a algum agente ambiental como o lipopolissacarídeo (LPS) durante o período gestacional pode levar a uma ativação imune materna (AIM) sendo esse evento um potente risco para o desenvolvimento do transtorno do espectro autista (TEA), caracterizado por déficits nas interações sociais, comunicação, aumento do comportamento ansioso e repetitivo sendo atrelados também quadros de disbiose. A exacerbação de quadros comportamentais do TEA pode estar relacionada a alterações gastrointestinais devido a comunicação do eixo microbiota-intestino-cérebro. Visto a possível relação dos quadros, essa via é sinalizada como um potente modulador do microbioma intestinal através do transplante de microbiota intestinal (TMI) que consiste na transferência do conteúdo fecal de um doador saudável para um receptor. **Objetivo:** Avaliar a atuação da AIM e o possível benefício do TMI sobre parâmetros comportamentais relacionados ao TEA em camundongos. **Métodos:** Realizado TMI na prole de fêmeas C57BL/6 que foram submetidas ao protocolo de ativação imune materna no 15^o dia gestacional através da aplicação intraperitoneal de LPS. O protocolo de TMI foi realizado na prole com 14 dias de vida e com 28 dias foram analisados parâmetros dos comportamentos tipo ansioso, sociabilidade e movimentos estereotipados. **Resultados:** Camundongos descendentes de AIM e que passaram pela intervenção de TMI apresentaram aumento da sociabilidade, aumentos do tempo de permanência no centro do aparato e diminuição dos movimentos estereotipados, diferente da prole sem intervenção. **Conclusão:** Os dados sugerem o benefício que a modulação da microbiota intestinal para o tratamento do TEA, com melhora de parâmetros comportamentais relacionados a esta doença.

Descritores: Comportamento; Disbiose; Microbioma Intestinal; Transplante de Microbiota Fecal; Transtorno do Espectro Autista.

ABSTRACT

Introduction: Exposure to an environmental agent such as lipopolysaccharide (LPS) during pregnancy can lead to maternal immune activation (AIM), which is a potent risk for the development of autism spectrum disorder (ASD), characterized by deficits in social interactions, communication, increased anxiety and repetitive behavior, which are also associated with dysbiosis. The exacerbation of ASD behavioral conditions may be related to gastrointestinal changes due to the communication of the microbiota-gut-brain axis. Given the possible relationship between the conditions, this pathway is signaled as a potent modulator of the intestinal microbiome through intestinal microbiota transplantation (IMT), which consists of transferring fecal content from a healthy donor to a recipient. **Objective:** To evaluate the performance of AIM and the possible benefit of IMT on behavioral parameters related to ASD in mice. **Methods:** IMT was performed on the offspring of C57BL/6 females that were submitted to the maternal immune activation protocol on the 15th gestational day through the intraperitoneal application of LPS. The IMT protocol was performed on the offspring at 14 days of age and at 28 days of age, parameters of anxiety-like behaviors, sociability and stereotyped movements were analyzed. **Results:** Mice descended from AIM and that underwent IMT intervention showed increased sociability, increased time spent in the center of the apparatus and decreased stereotyped movements, unlike the offspring without intervention. **Conclusion:** The data demonstrate that the modulation of the gut microbiota was beneficial for TEA receptors, signaling through the modulation of the gut microbiota a potential treatment.

Keywords: Behavior; Dysbiosis; Lipopolysaccharides; Gastrointestinal Microbiome; Fecal Microbiota Transplantation; Autism Spectrum Disorder.

LISTAS

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| SNE - | Sistema Nervo Entérico |
| TEA - | Transtorno do Espectro Autista |
| LPS - | Lipopolissacarídeo |
| BDNF - | Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro |
| SNC - | Sistema Nervoso Central |
| CEI's - | Células Epiteliais Intestinais |
| IgA - | Imunoglobulina A |
| BHE - | Barreira Hematoencefálica |
| PAMP - | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PRR - | Receptor de Reconhecimento Padrão |
| IL-6 - | Interleucina 6 |
| IL-1 - | Interleucina 1 |
| TLR - | Receptor Toll Like |
| TGF - α | Fator de crescimento transformador α |
| VEGF - β | Fator de crescimento endotelial vascular β |
| 5-HT - | Serotonina |
| IL-17 - | Interleucina 17 |
| AIM - | Ativação Imune Materna |
| TNF - α | Fator de necrose tumoral α |
| HPA- | Hipotálamo-hipófise-adrenal |
| TMI- | Transplante de microbiota intestinal |
| LANEX- | Laboratório de Neurociência Experimental |
| UNISUL- | Universidade do Sul de Santa Catarina |
| PBS - | Tampão fosfato-salino |
| UFSC - | Universidade Federal de Santa Catarina |
| CFMV - | Conselho Federal de Medicina Veterinária |
| ELISA - | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| SBNeC - | Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento |
| i.p - | Intraperitoneal |
| MIA - | Morte Indolor Assistida |
| CEUA - | Comitê de Ética no Uso Animal |

Lista de quadros

| | |
|--------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Grupos | 31 |
| Quadro 2 – Variáveis de estudo | 34 |

Lista de figuras

| | |
|--------------------------------------|---|
| Figura 1 - Desenho experimental..... | 3 |
|--------------------------------------|---|

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 1.1.1 Microbiota intestinal | 11 |
| 1.1.2 O eixo Microbiota-Intestino-Cérebro | 17 |
| 1.1.3 A ativação imune materna e a neuroinflamação..... | 19 |
| 1.1.4 Alterações no neurodesenvolvimento e o transtorno do espectro autista..... | 24 |
| 1.1.5 Transplante de microbiota intestinal no transtorno do espectro autista | 27 |
| 2. OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 3. MÉTODOS | 30 |
| 3.1 TIPO DE ESTUDO | 30 |
| 3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS | 30 |
| 3.3 ANIMAIS..... | 30 |
| 3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO | 31 |
| 3.5 TESTES/ENSAIOS/TECNICAS | 32 |
| 3.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO..... | 34 |
| 3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS | 35 |
| 3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA..... | 35 |
| 4.0 ARTIGO | 36 |
| 5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 39 |
| REFERÊNCIAS | 40 |
| ANEXO A - Parecer Aprovação do Comitê de Ética..... | 58 |
| ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do Doutorado | 59 |

1. INTRODUÇÃO

O intestino possui um sistema nervoso próprio, denominado sistema nervoso entérico (SNE), o qual apresenta semelhanças com o cérebro em termos de componentes neuronais, neurotransmissores e independência funcional, sendo conhecido como segundo cérebro¹⁻⁵. Alterações na microbiota intestinal no início da vida causam mudanças na fisiologia intestinal, que podem levar a efeitos duradouros na saúde geral^{6,7}. A microbiota intestinal atinge a sua maior diversidade e estabilidade de microorganismos na idade adulta^{8,9}, e fatores como a nutrição, hábitos de vida, fatores ambientais, infecções, uso de excessivo de antibióticos podem alterar esse microbioma¹⁰⁻¹³.

O segundo cérebro, como é chamado o intestino, não só completa sua função local como pode desempenhar funções semelhantes ao cérebro, como regular comportamentos^{14, 15}, funções cognitivas, incluindo capacidade de aprendizagem e memória, assim como humor e emoções^{16, 17}. A interrupção da relação simbiótica das bactérias residentes pode levar ao surgimento de organismos oportunistas, incluindo patógenos, que se deslocam para a flora intestinal resultando em um fenômeno conhecido como disbiose. A disbiose tem sido associada a condições adversas, como infecção por *Clostridioides difficile* (CDI), síndrome metabólica, doença inflamatória intestinal (DII), esquizofrenia e autismo¹⁸⁻²⁰. A infecção por patógenos induz a modificações no comportamento, evasão social, apetite diminuído e aumento do comportamento semelhante à ansiedade²¹⁻²³.

Um quadro disbiótico pode levar com que moléculas do lúmen intestinal atuem diretamente no SNC pela barreira hematoencefálica (BHE) podendo causar sua degradação, ocasionando a etiopatogenia de patologias como autismo, demência e transtorno de humor^{24, 25}. A microbiota pode afetar a fisiologia da BHE através da modulação por meio de neurotransmissores derivados do intestino como serotonina e metabólitos bacterianos, regulando a permeabilidade, podendo levar à ativação da micróglia e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6 e 1 β tendo impacto no neurodesenvolvimento, influenciando a função do SNC^{26,27}.

Como já observado, a microbiota intestinal pode modular comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão em camundongos e levar a alterações moleculares no hipocampo, hipotálamo e fígado²⁸. Collins e colaboradores (2012)

identificaram que interações entre microrganismos intestinais e hospedeiro podem desregular funções neuroimunes, ativando o sistema imune e iniciando uma resposta^{9, 29,30}. É possível observar a evidência de que essas comunidades microbianas afetam a saúde e que podem ser manipuladas para tratar doenças através de intervenções terapêuticas³¹.

Especificamente, a ativação imune materna (AIM) apresenta implicações na interação entre o sistema imunológico da mãe, se estendendo ao embrião, feto e neonato. A AIM apresenta influencia no desenvolvimento do SNC fetal por meio de mediadores inflamatórios encontrados no sangue e no líquido amniótico de mães com TEA e esquizofrenia³²⁻³⁵, sendo a janela temporal e a magnitude da inflamação cruciais para o prognóstico^{36, 37}. A expressão de citocinas pode afetar o desenvolvimento normal do cérebro na prole, havendo uma correlação positiva entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico e a ocorrência de TEA³⁸, onde frequentemente apresentam níveis elevados, correlacionando com a gravidade dos sintomas^{39, 40}.

O TEA está dentro dos transtornos do neurodesenvolvimento^{41, 42}, sendo de alta complexidade, caracterizado por gravidade fenotípica, capacidade social prejudicada, déficits comunicativos verbais e não verbais e comportamentos estereotipados⁴³, com hipótese de que estaria ligado a respostas imunes gestacionais e perinatais desreguladas estando associados a uma modificação da composição da microbiota intestinal, perturbando o eixo microbiota-intestino-cérebro⁴⁴⁻⁴⁷. Pacientes com TEA que sofrem de comorbidades gastrointestinais apresentam um maior risco de desenvolverem alterações de comportamento sendo esses distúrbios quatro vezes mais prevalentes nessa população^{48,49}.

A microbiota intestinal se mostra com capacidade de modular a emoção, motivação e funções cognitivas mais elevadas. Essas modulações e alterações ocorrem através do eixo microbiota-intestino- cérebro^{50,51}. Kang e colaboradores (2017) mostraram a eficácia potencial de uma terapia de transferência de microbiota em 18 pacientes que apresentaram escores significativamente menores de sintomas gastrointestinais e sintomas de TEA após o tratamento^{51,52}. E embora até o momento houvesse um grande progresso no desenvolvimento de suporte comportamental e psicológico para indivíduos com TEA, não há terapia medicamentosa aprovada para os principais sintomas, considerando a natureza heterogênea dessa condição, o

desenvolvimento de uma terapia médica segura e eficaz se torna um desafio⁵³⁻⁵⁶.

Uma opção de modulação da microbiota é o transplante de microbiota intestinal (TMI), que consiste em um processo de transplantar fezes de um doador saudável para o intestino do receptor tendo em vista a modulação da flora intestinal prejudicada, apresentando eficácia no tratamento de infecções recorrentes por *C. Difficile*⁵⁷. A remodelação da microbiota intestinal através do TMI não apenas recupera a função digestiva, mas também melhora o cérebro e o comportamento, podendo ser usado no tratamento de muitas doenças cerebrais, como o TEA. Entender e modular o eixo da microbiota-intestino-cérebro pode ser uma maneira eficaz e promissora de melhorar os sintomas da doença^{58,59}.

A questão que não é bem compreendida se dá na relação do eixo intestino-microbiota-cérebro e sua repercussão na gravidade dos sintomas no TEA. Sendo assim, formulou-se a seguinte pergunta de pesquisa: Quais efeitos de um transplante de microbiota intestinal sob os aspectos comportamentais em um modelo animal de TEA?

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Microbiota intestinal

O intestino é classificado como o maior órgão digestivo, imune e endócrino do corpo humano, possuindo um sistema nervoso próprio, denominado sistema nervoso entérico (SNE), que apresenta semelhanças com o cérebro em termos de componentes neuronais, neurotransmissores e independência funcional^{60,61}; o número de bactérias no corpo dez vezes superior ao número de células humanas⁶², com uma variedade de 10 a 100 trilhões de células microbianas encontradas em simbiose⁶³. Uma grande proporção destes microorganismos encontram-se no intestino, que fornece alimento para os mesmos, enquanto a microbiota também influencia o desenvolvimento e a função do intestino, trabalhando em conjunto para executar as tarefas de digestão, funções imunológicas e endócrinas e neurotransmissão^{64, 65}.

O termo microbiota refere-se a todos os microorganismos que vivem no ser humano, como bactérias, arqueias, fungos, vírus e protozoários, vivendo em suas

superfícies internas e externas, na pele, na boca, no trato respiratório, gastrointestinal e vaginal^{66, 67}. O termo microbioma descreve todos os genes expressos em todos esses microorganismos⁶⁸. De poucos microorganismos no estômago e intestino delgado, até uma concentração de aproximadamente 1.012 bactérias no intestino grosso⁶⁹, representada principalmente pelos filos *Bacteroidetes* (inclui o gênero *Bacteroides*) e *Firmicutes* (inclui os gêneros *Clostridium* e *Eubacterium*) que constituem mais de 90% das espécies na microbiota intestinal^{70,71}. Entre eles, as bactérias são predominantes. O microbioma intestinal humano forma três enterótipos distintos, cada um incluindo os gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus* e são descritos como independentes de sexo, idade, nacionalidade e índice de massa corporal⁷².

É nomeado microbioma intestinal por esses microorganismos habitarem principalmente a superfície da pele e os tratos digestivo, respiratório, urinário e reprodutivo, sendo os que habitam no trato digestivo os mais importantes⁵. Possui uma diversidade de diferentes espécies que variam de 300 a 3.000, com quase 10 vezes o número total de células humanas; onde os genes codificados ultrapassam 5 milhões, sendo mais de 200 vezes o número de genes humanos^{4, 6}. Múltiplos fatores contribuem para formação dessa diversidade como, exposição aos microorganismos após o nascimento, a idade, a genética (fator intrínseco), a dieta, intervenções terapêuticas e estímulos ambientais (fatores extrínsecos)⁷.

A grande maioria das células epiteliais intestinais (CEIs) são enterócitos que apresentam papel na digestão e são reconhecidas como tendo funções imunológicas^{73, 74}. Seguidas dos enterócitos, a maior população de CEI's são as células cálices, especializadas na secreção de muco e críticas para lubrificação e passagem normal de conteúdo intestinal e apresentam papéis-chave na proteção contra bactérias^{75, 76}. As células de Paneth são restritas ao intestino delgado e contribuem para a defesa do hospedeiro através da secreção de peptídeos antimicrobianos. Espalhadas por todo o epitélio intestinal estão as células enteroendócrinas que são especializadas em detectar o conteúdo luminal e liberar uma variedade de mediadores humorísticos e paracrinos^{77, 21}. O epitélio é regulado dinamicamente pelo sistema imunológico da mucosa, pelo SNE e pelas células enteroendócrinas de modo que a barreira intestinal é regulada para se ajustar aos desafios do ambiente luminal, incluindo as comunidades microbianas que formam uma rede ecológica no intestino.

A composição da microbiota intestinal depende da predisposição genética de um indivíduo, idade, nutrição, atividade física, fatores ambientais, estresse, infecção, outras doenças e uso de antibióticos^{78, 79} e diferentemente de outros órgãos periféricos, ele pode funcionar sem instruções do cérebro²². O cérebro intestinal não apenas completa sua função local, mas também regula o comportamento e a cognição humana, de maneira semelhante ao cérebro⁸⁰. A interrupção do equilíbrio das espécies, da relação simbiótica das bactérias residentes, pode levar ao surgimento de organismos oportunistas, incluindo patógenos, que se deslocam para a flora intestinal resultando em um fenômeno conhecido como disbiose. Sendo o termo usado para caracterizar um microbioma intestinal que é alterado de seu estado normal, geralmente uma diminuição da diversidade e abundância de bactérias²².

O microbioma intestinal apresenta sua variação ao decorrer da idade com transições na infância, adolescência e vida adulta. É representativo da composição bacteriana do ambiente externo e da pele materna, onde a forma que é realizada do parto afeta a formação do microbioma inicial^{81,82}. O processo de colonização é iniciado no pré-natal, à medida que microrganismos são detectados na placenta e no mecônio^{39, 83, 84}. Ao passar pelo canal do parto, o bebê encontra algumas bactérias /como *Lactobacillus*, que colonizam o trato gastrointestinal, a boca, a pele e a conjuntiva. Nessa passagem a colonização é iniciada por *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Prevotella* como gêneros predominantes⁸⁵. Caso o parto seja feito por cesariana, a predominância será do gênero como *Clostridium*, do ar e da pele materna^{86, 87}. Após o início de alimentos sólidos, a diversidade da microbiota intestinal aumenta^{88, 89}.

A proporção de bactérias anaeróbias classificadas como *Firmicutes* começa a aumentar, tornando o microbioma semelhante ao de um intestino adulto aos três anos de idade^{90, 86}. A composição da microbiota intestinal de um indivíduo depende do modo de parto, predisposição genética, idade, nutrição, atividade física, fatores ambientais, estresse, infecções, outras doenças e uso de antibióticos. A função cerebral e a composição psicológica são agora cada vez mais consideradas como tendo um relacionamento recíproco com o intestino⁹¹. Em seu estado saudável, a microbiota intestinal consegue ter interação com o metabolismo humano, equilibrando o sistema imunológico, protegendo contra micróbios patogênicos, metabolizando carboidratos não digeríveis, produzindo vitaminas essenciais e substâncias antimicrobianas, estimulando a angiogênese e reforçando a barreira intestinal^{26,16,92}.

A composição microbiana varia com a idade, dieta, doenças e geografia^{10,32}. Tanto a maturação quanto a função do cérebro e da mente são impactadas por esse microbioma⁹³ e o desequilíbrio deste ecossistema tem sido associado com o desenvolvimento de várias doenças inflamatórias intestinais⁹⁴.

A composição, diversidade e estabilidade do microbioma de cada indivíduo é determinando por uma infinidade de fatores genéticos e ambientais do hospedeiro, como temperatura, humidade, nutrição, estresse oxidativo, resposta imunológica inata e adaptativa contra os microrganismos e seus produtos de secreção^{95,96}. Sendo assim, é possível observar que cada microbioma é específico, apresentando alterações de acordo com os fatores que o determinam, onde a microbiota da pele é considerada a primeira barreira biológica do organismo, apresenta influencia na função imune onde as anormalidades dessa microbiota estão intimamente relacionadas a doenças da pele⁹⁷. Na microbiota do trato respiratório o principal papel é o desenvolvimento e função do sistema respiratório,⁹⁸ sendo o da nasofaringe em crianças, sazonal. E a microbiota vaginal varia ao longo do ciclo menstrual⁹⁹, sendo saudável, é necessária para a manutenção da saúde feminina e é benéfica para o desenvolvimento da microbiota comensal na prole¹⁰⁰.

Em seu funcionamento normal, a microbiota intestinal apresenta relação simbiótica com nossas células entéricas e contribui para processos fisiológicos básicos, incluindo digestão, crescimento e autodefesa¹⁰¹. Há a descrição da existência de períodos críticos, sendo eles a infância, a adolescência, a vida adulta e a velhice, sendo a microbiota intestinal relativamente estável na idade adulta, enquanto que na velhice, a diversidade diminui, e a riqueza de alguns patógenos oportunistas, incluindo algumas espécies de *Clostridium*, aumenta¹⁰². Sendo críticos para o desenvolvimento de perturbações psiquiátricas, na medida em que se choca com fases chave para a colonização bacteriana e para o neurodesenvolvimento²⁹. Assim, é possível que a composição da comunidade microbiana que coloniza o intestino já no nascimento até a infância, parece influenciar o risco de desenvolver certas doenças³⁴.

Assim como a composição filogenética da microbiota infantil se estabiliza por volta dos 2–3 anos^{56,103} o cérebro dos neonatos também cresce aproximadamente de 36% a 90% do seu futuro volume adulto nesse período, onde a formação de novas sinapses atinge um pico entre a idade de três meses e dois anos¹⁰⁴. Sendo assim, o estabelecimento da composição microbiana saudável cai na mesma janela de tempo crítica para o desenvolvimento do cérebro¹⁰⁴. Portanto, acredita-se que alterações no

nível de estresse materno pré-natal, infecções ou dieta podem desempenhar um papel na fisiopatologia dos distúrbios do neurodesenvolvimento^{29,62}, sendo que esses fatores podem ter implicações duradouras para a saúde física e mental do indivíduo⁷⁵⁻¹⁰⁵. Apresentam ainda correlações entre composição de microbiota infantil e temperamento comportamental, atividade funcional/conectividade no cérebro e função cognitiva¹⁰⁶.

Nos primeiros meses de vida, o sistema imunológico da criança é altamente dinâmico e sofre mudanças¹⁰⁷. Os neonatos apresentam baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, diferenciação diminuída e interação falha de células dendríticas, fagocitose defeituosa, além de deficiência nas respostas humorais específicas, incluindo níveis baixos de imunoglobulina A (IgA)¹⁰⁸. A IgA fornece um bom exemplo de como a microbiota medeia a fisiologia do hospedeiro através da modulação imunológica e desempenha um papel na influência do equilíbrio das vias imunológicas e metabólicas no epitélio intestinal. Sua ausência pode acarretar em mudanças na expressão dos genes envolvidos na defesa do hospedeiro, com produção excessiva de proteínas antimicrobianas e respostas pró-inflamatórias para compensar a deficiência microbiana¹⁰⁹. Na presença dessa imunoglobulina a microbiota intestinal altera a expressão de genes envolvidos no metabolismo e armazenamento de lipídios; resultando em uma resposta imune-metabólica fundamental para a homeostase²⁸.

Na adolescência, o cérebro passa por remodelação, incluindo poda, mielinização, alterações volumétricas em várias regiões e alterações na conectividade funcional^{110,111}. Todos estes fatores alterados por padrões como dieta, sono, exposição a drogas, infecções maternas, levando o indivíduo à vulnerabilidade e ao desenvolvimento de problemas de saúde mental^{112,113}. Dado que todos esses fatores têm sido associados a alterações no eixo microbiota-intestino-cérebro em adultos, a exploração da microbiota durante o período sensível da adolescência tem o potencial de fornecer insights e intervenções para melhorar o bem-estar dos adolescentes^{116,115}. Embora a microbiota adulta se apresente pouco mais complexa do que a de um neonato, acaba se mostrando estável até a velhice, se não perturbada¹¹⁶. Sendo o envelhecimento associado a alterações na fisiologia intestinal, incluindo distúrbios de motilidade gástrica e alterações degenerativas no SNE, produzindo efeitos na composição e função do microbioma intestinal¹¹⁷.

Caso haja uma estimulação contínua do sistema imunológico pela microbiota

intestinal, é ativado um estado de inflamação fisiológica, sendo ele mecanismo rápido e eficiente de defesa contra patógenos¹¹⁸. Em caso de exacerbação, o quadro instalado é de inflamação em um grau maior. A inflamação contribui para a velocidade do processo de envelhecimento e pode evoluir para o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade¹¹⁹, desde distúrbios neurológicos como a doença de Alzheimer, transtorno do espectro autista¹²⁰ até distúrbios metabólicos e outros físicos, como doenças cardíacas, osteoporose e diabetes tipo II^{121,122}.

Uma microbiota intestinal saudável é essencial para o desenvolvimento do comportamento social¹²³, diante de que funções cognitivas, incluindo capacidade de aprendizagem e memória, assim como humor e emoção estão ligadas com esse sistema^{24,124}. A infecção por patógenos induz a modificações no comportamento, evasão social, apetite diminuído e aumento do comportamento semelhante à ansiedade. Pontos causados por um quadro disbiótico instaurado podendo levar, onde a comunicação cruzada normal entre o intestino e o SNC acaba sendo perturbada pelas moléculas que saem do lúmen intestinal para a corrente sanguínea e desencadeiam uma inflamação sistêmica crônica. Esse processo pró-inflamatório pode ser direcionado para a barreira hematoencefálica (BHE) através da formação de anticorpos, podendo causar sua degradação, levando ao colapso e a etiopatogeniade patologias como autismo, demência e transtorno de humor¹²⁵.

A microbiota pode afetar a fisiologia da BHE através da modulação por meio de neurotransmissores derivados do intestino e metabólitos bacterianos, regulando a permeabilidade. Com a função de barreira interrompida, a translocação de metabólitos bacterianos e mediadores inflamatórios ficam facilitados para a circulação, podendo levar à ativação da micróglia tendo impacto no neurodesenvolvimento^{125,126}. A atuação no trato gastrointestinal da imunidade inata e adaptativa desempenha papel importante, mantendo a homeostase patógeno- hospedeiro. A comunicação em nível de imunidade inata, apresenta os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais descrevem quais os alvos patogênicos que serão reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs)^{126,127}. Componentes da parede externa de bactérias gram-negativas como o LPS, podem estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-6 e IL-1 β , através da ligação aos receptores *Toll-like* (TLRs) TLR4, que são expressos em monócitos, macrófagos e microglia.

Os TLR4 podem estar relacionados ao desenvolvimento de aprendizado e memória. A micróglia se apresenta como um componente importante do sistema imunológico e potencial contribuinte para a inflamação, sendo ela uma célula imune residente do cérebro com função na atividade neuronal, plasticidade sináptica e fagocitose. Apoiadora da sobrevivência de neurônios e progenitores neuronais através da secreção de fatores de crescimento^{128,129}. Sua ativação inicia uma resposta imune inflamatória e específica do antígeno através de fatores de transcrição pró-inflamatória. É possível então a quebra na permeabilidade intestinal, resultando em translocação de bactérias do lúmen do intestino para a circulação sistêmica, sendo que essa sinalização pode acontecer também do intestino para o cérebro através do nervo vago ou podem acessar o cérebro diretamente através dos órgãos circumventriculares (regiões da BHE que são relativamente permeáveis)^{130,131}. Outros componentes do intestino inflamado podem surgir, como células T, anticorpos e citocinas pró-inflamatórias que prejudicam a função da BHE e ativam a micróglia¹³².

A micróglia regula a atividade pró-inflamatória dos astrócitos pela liberação de duas proteínas, o fator de crescimento transformador α (TGF- α) e o fator de crescimento endotelial vascular B (VEGF-B). Estes apresentando efeitos opostos nos astrócitos, com o VEGF-B estimulando o astrócito a uma ação pró-inflamatória, enquanto o TGF- α tem o efeito oposto. O aumento da produção de TGF- α e a diminuição do VEGF-B podem reverter o processo inflamatório e dar origem ao auto-reparo^{15,133,134}. A microbiota intestinal também pode influenciar a função do SNC através da capacidade de sintetizar ou imitar uma série de moléculas neuroativas de sinalização do hospedeiro¹¹¹.

1.1.2 O eixo microbiota-intestino-cérebro

Existe uma conexão fisiológica bidirecional que troca informações entre a microbiota intestinal e o cérebro, sendo esse modelo chamado de “eixo da microbiota-intestino-cérebro”²⁵. Este eixo integra vias imunológicas, neurais, endócrinas e metabólicas, sendo que a disfunção do mesmo tem efeitos fisiopatológicos no hospedeiro^{9,137}. A parte neural deste eixo é composto pelo SNC e pelo SNE do sistema digestivo, e está envolvido na motilidade intestinal, secreção de hormônios e produção de ácidos, bicarbonatos e muco. Este faz parte de uma rede fisiológica,

incluindo o sistema endócrino, o sistema imunológico (citocinas, quimiocinas) e o sistema nervoso autônomo (incluindo neurônios eferentes e aferentes)^{14,138}.

O sistema imunológico atua como um intermediário importante entre a microbiota intestinal e o cérebro. As citocinas podem sinalizar para o cérebro a partir da periferia através do nervo vago, sendo o comportamento da doença induzido pela infecção intimamente relacionado a esse último, ou podem acessar o cérebro diretamente através dos órgãos circunventriculares²⁸. Anormalidades do nervo vago estão relacionadas a distúrbios gastrointestinais, cardiovasculares e psiquiátricos¹³⁹. O nervo vago é um canal de comunicação primário entre o microbioma intestinal e o cérebro e é o componente integrante do eixo microbiota-intestino-cérebro. Faz a regulação da homeostase metabólica, controlando as funções viscerais, bem como a resposta imune inata e medeia as informações entre a microbiota e o cérebro que afetam o comportamento^{64,115}, sendo o caminho nervoso a maneira mais rápida pela qual a microbiota afeta o cérebro e o comportamento^{140,141}. A condução neural é efetiva através do nervo vago, que reconhece sinais neurais liberados pelo hospedeiro e responde adequadamente para solicitar sua própria proliferação^{142,143}.

Esse processo ocorre com os aferentes primários enviando sinais microbianos e ativando o nervo vago para em seguida, transmitirem a mensagem ao cérebro. Sendo o décimo (X) nervo craniano, o nervo vago representa a principal via aferente da cavidade abdominal para o cérebro, sendo que a microbiota intestinal seria capaz de ativar essa via para mediar seus efeitos comportamentais e fisiológicos no cérebro^{144,145}. A interação dinâmica que se estabelece entre o grande e o pequeno cérebro (intestino) possui um papel crítico para a homeostase do hospedeiro⁶⁴. Por sua vez, o papel dinâmico que a microbiota exerce no eixo cérebro-intestino pode ser mediado por mecanismos diretos e indiretos, imunes e não imunes¹⁴⁶; sabe-se, por exemplo, que a disbiose microbiana está associada a alterações gastrointestinais ou metabólicas. Collins e colaboradores identificaram que interações entre microrganismos intestinais e hospedeiro podem desregular funções neuroimunes, podendo assim ter um forte impacto no comportamento, designando o eixo microbiota-intestino-cérebro⁹. Aferentes vagais trabalham para detectar moléculas de estiramento e tensão intestinais, como subprodutos bacterianos, hormônios ou neurotransmissores, dependendo de sua localização e tipo. Esses aferentes

possuem grande variedade de receptores expressos, sendo classificados como polimodais por responderem a essa variedade de sinais mecânicos, químicos ou hormonais¹⁴⁷.

Durante o desenvolvimento embrionário, em que ocorrem períodos críticos para o desenvolvimento neural, é possível que seja biologicamente relevante que estes períodos se alinhem com alterações da microbiota que levam a influências no desenvolvimento ou declínio de outros sistemas corporais; isso inclui, mas não se limita ao sistema imunológico inato, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o desenvolvimento cerebral em geral^{29,148}, sendo evidente a importância do diálogo harmonioso entre o grande e o pequeno cérebro.

Ainda, visto que essas respostas imunes periféricas e centrais apresentam uma ligação com o eixo HPA, levando à iniciação e ao tráfego de monócitos, alterações subsequentes no fenótipo da microglia podem resultar em um quadro neuroinflamatório como o observado no cérebro de pacientes com TEA¹⁴⁹. Assim, é possível hipotetizar que essas comunidades microbianas afetam a saúde e que podem ser manipuladas para tratar doenças através de intervenções terapêuticas, sendo que é mais fácil alterar o microbioma do que o genoma humano³³.

1.1.3 Ativação imune materna e neuroinflamação

O sistema imune é formado por células e moléculas que protegem o organismo contra doenças, sendo que certos patógenos e seus produtos são capazes de ativar este sistema, iniciando assim uma resposta imune²⁶. Especificamente, a ativação imune materna (AIM), por diferentes agentes patogênicos, apresenta implicações na interação entre o sistema imunológico da progenitora, se estendendo ao embrião, feto e neonato. Já há algum tempo, é possível ver relação entre infecção materna e distúrbios do desenvolvimento neurológico. Como exemplo, após a pandemia de rubéola de 1964, a incidência de TEA e esquizofrenia aumentou de menos de 1% na população não exposta para cerca de 13% e 20%, respectivamente¹⁵⁰. A AIM apresenta influência no desenvolvimento do SNC fetal por meio de mediadores inflamatórios encontrados no sangue e no líquido amniótico de mães com TEA e esquizofrenia¹⁵⁰⁻¹⁵².

A comprovação de que essas proteínas atravessam a placenta e agem diretamente sobre o cérebro fetal ainda é conturbada, porém, de alguma forma, induz alterações em várias citocinas no cérebro fetal em questão de horas^{152,153}. A microbiota hospedeira modula as respostas imunes locais no cérebro assim como a neuroinflamação pode influenciar a composição da microbiota²⁰. No campo experimental, tem-se associado a AIM na patogênese do TEA com eventos neuroinflamatórios no cérebro em desenvolvimento como um componente importante da má-formação cerebral¹⁵⁴. É sugerido ainda, que a AIM induz mudanças duradouras na atividade do sistema imunológico e na microbiota, o que se acredita estar envolvido em alterações comportamentais na prole^{20,155}.

A inflamação materna interrompe as redes de neurônios inibitórios e sugerem que o microbioma intestinal materno pode ser um fator de risco contribuinte para anormalidades comportamentais induzidas pela AIM⁸⁵. Indivíduos com TEA costumam ter níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, e a análise transcriptômica de amostras cerebrais *post mortem* revela um aumento na regulação dos genes da resposta imune¹⁵⁶. Durante a gravidez, o sistema imunológico materno, tanto inato quanto adaptativo, precisa manter o equilíbrio entre a tolerância imunológica contra o feto e a resposta imune contra patógenos invasores¹⁵⁷. É indicado que um dos fatores de risco para induzir a AIM é uma infecção materna por patógenos, sendo um fator de risco ambiental para o desenvolvimento do TEA na prole^{158,159}.

O risco para o desenvolvimento do TEA se apresenta maior quando a infecção ocorre durante a janela de tempo crítico do desenvolvimento neural, dependendo do patógeno; infecções virais no primeiro trimestre da gravidez e infecções bacterianas no segundo trimestre, se associam a um maior risco da prole desenvolver TEA^{160,161}. Além da janela temporal, a magnitude da inflamação é crucial para o prognóstico dessas crianças^{162,163}. A expressão de citocinas pode afetar o desenvolvimento normal do cérebro na prole, havendo uma correlação positiva entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no líquido amniótico e a ocorrência de TEA¹⁶⁴. Estes indivíduos com TEA frequentemente apresentam níveis plasmáticos elevados de citocinas pró-inflamatórias, que muitas vezes se correlacionam com a gravidade dos sintomas^{165,166}.

Interações através do eixo cérebro-intestino-microbiota seria um mecanismo instigador crítico de anormalidades comportamentais e corticais no modelo de AIM, com a presença da IL-6 e de IL-17 α ^{167, 168}, sendo suficiente para induzir vários comportamentos semelhantes a TEA e esquizofrenia na prole^{129, 169}. Ainda, alterações das respostas imunes maternas ao longo dessa via provocam anormalidades comportamentais associadas e estão ligadas a espécies bacterianas específicas no microbioma intestinal^{131, 170}. A citocina IL-6 altera a expressão de proteínas pois é pró-inflamatória, ajudando assim os glóbulos brancos a migrarem através de barreiras epiteliais, resultando na desregulação da IL-6 no sangue periférico e no fluido espinal e cerebral em indivíduos com autismo^{171, 172}. O aumento da permeabilidade intestinal nessas crianças pode ser uma consequência da ativação imune no trato gastrointestinal^{172, 173}. Portanto, uma inflamação durante a gravidez pode resultar em alteração da mielinização no cérebro e possivelmente em alterações comportamentais, já que é causa um estado crônico pró-inflamatório no cérebro fetal com consequentes alterações generalizadas na expressão genética neuronal e danos excitotóxicos aos neurônios em desenvolvimento.

Acredita-se que as baixas concentrações de IL-6 e fator de necrose tumoral tipo α (TNF- α) no cérebro fetal desempenham um papel fisiológico na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência das células neuronais, enquanto a inflamação excessiva parece aumentar o risco de desenvolvimento cortical anormal¹⁷⁴. Além disso, a IL-6 altera o equilíbrio entre as células Th pró-inflamatórias e as células T regulatórias na placenta, alterando seu fenótipo para o perfil pró-inflamatório¹⁷⁵. Finalmente, a IL-6 secretada por de células Th17 resulta na produção de IL-17 α , específico para a placenta¹⁷⁶, o que levanta a hipótese de que a mesma atingiria a circulação fetal e poderia alterar o desenvolvimento cerebral fetal¹⁷⁷.

Assim, mostra-se que a AIM pode levar a mudanças duradouras na expressão de moléculas imunes conhecidas por regular a conectividade neural e a função na prole¹²⁸. Estas citocinas atravessam a barreira placentária e hematoencefálica modulando o sistema nervoso do feto, ou pelo reconhecimento de patógenos pelas células trofoblásticas que irão liberar citocinas, agindo diretamente no feto¹²⁹. Neste processo, a microglia tem um papel importante como mediador neuroinflamatório, uma vez que afeta diretamente a maturação neuronal ao desempenhar ações na poda

sináptica, na homeostase e nos circuitos neuronais¹²⁷. Neste contexto, a exposição materna a insultos infecciosos ou inflamatórios, pode comprometer o desenvolvimento e função do encéfalo fetal e resultar em alterações a curto e a longo prazo¹⁷⁸.

Modelos animais envolvendo ativação imune no início da vida fornecem suporte para um papel causal da desregulação imune no TEA. Estudos em animais de laboratório demonstram que fatores ambientais, como aqueles que desencadeiam a ativação do sistema imunológico precoce, podem ser suficientes para causar fenótipos que se assemelham a TEA^{179,180}. A AIM em animais pode resultar em filhotes que exibem três características comportamentais essenciais do TEA, incluindo diminuição da interação social, comunicação prejudicada e aumento do comportamento estereotipado^{130,181}. Esses estudos em animais forneceram novas evidências sobre os mecanismos pelos quais a inflamação e a microbiota intestinal influenciam os comportamentos neurológicos¹⁴⁴. Uma vez considerado imune-privilegiado, o SNC tem se mostrado em constante comunicação com o sistema imunológico¹⁸².

Embora a resposta neuroinflamatória seja iniciada para exercer efeitos protetores, ela também pode exercer efeitos prejudiciais e causar inflamação generalizada através da BHE. Essa inflamação pode ser iniciada em resposta a uma ampla variedade de estímulos, incluindo infecções, distúrbios auto-imunes ou neurodegenerativos, lesão cerebral traumática ou estresse. Os mediadores derivados de células imunes influenciam o ambiente através da interação com os principais atores, como a microglia¹⁸³. A inflamação pode apresentar seu lado bom e ruim, que fornece tanto neuroproteção quanto consequências deletérias^{159,184}. A ativação persistente de microglia pode contribuir para a elevação nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tirando o equilíbrio entre estados pró e anti-inflamatórios para favorecer uma condição pró-inflamatória perigosa, dificultando os processos de neurodesenvolvimento^{185,186}.

A micróglia uma vez ativada está criticamente envolvida em eventos neuronais em vários estágios do desenvolvimento e na idade adulta, incluindo a remodelação sináptica para melhorar a sinalização da rede neuronal detectam mudanças ambientais no cérebro e regulam processos neuroinflamatórios^{187,188}. Há um apontamento que a microbiota intestinal teria um papel crítico em todos os aspectos

da maturação, morfologia e função imunológica da microglia¹⁵. Uma das etiologias do autismo seria que a microglia contribuiria não apenas para eventos inflamatórios, mas também para o desenvolvimento neural, onde esses eventos inflamatórios durante o desenvolvimento do cérebro são prejudiciais, levando a um aumento de sinapses imaturas que podem ser responsáveis por déficits cognitivos e comportamentais^{189,190}. A microglia também pode modular diretamente a cognição, por meio da secreção de mediadores inflamatório; no entanto, o papel regulatório dessas citocinas na cognição é dependente de dose, uma vez que a superexpressão de IL-1 β ou TNF- α interrompe a aprendizagem e captação normal de memória em roedores¹⁶⁸. Ainda, essas citocinas podem modular os níveis de BDNF, alterando a plasticidade sináptica no hipocampo^{191,192}.

As redes bidirecionais entre a microbiota cerebral e intestinal são mantidas através do eixo HPA e do eixo microbiota-intestino-cerebral¹⁹³. A exposição a estressores externos estimula o cérebro a secretar hormônios como o fator de liberação de corticotrofina, através do eixo HPA, que estimula o sistema imunológico do intestino modificando a composição da microbiota e sua produção de subprodutos^{130,194}. Uma expressão em excesso desses subprodutos da microbiota intestinal, como endotoxinas, perturba as respostas imunes gastrointestinais, que podem causar a secreção de neurotransmissores como serotonina e catecolaminas¹⁹⁵. A injeção intraperitoneal de LPS pode levar o hipocampo a uma condição de inflamação e assim, ocasionar declínio cognitivo e ansiedade nos camundongos, uma vez que na microbiota alterada pode ocorrer supressão da expressão do BDNF^{196,197}. Esses resultados sugerem que a endotoxemia induzida por microbiota alterada pode causar declínio cognitivo e ansiedade ao induzir neuroinflamação no cérebro^{18,19}.

1.1.4 Alterações no neurodesenvolvimento e o transtorno do espectro autista

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos têm despertado um crescente interesse na relação entre a AIM e os transtornos de neurodesenvolvimento¹⁹⁸. Uma hipótese para a associação entre transtornos psiquiátricos e a AIM é a alteração nos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias no soro materno. Estes achados

foram encontrados na prole jovem de roedores sendo associado a um comportamento relacionado à psicose. Estudos ainda utilizando modelos animais evidenciaram que após a injeção de LPS em ratas prenhas, houve restrição do crescimento fetal e lesões na substância branca do SNC de prole jovem^{22,199}. Assim, é provável que um aumento do nível de citocinas, durante e após a infecção materna, conduzam a efeitos a longo prazo sobre a função encefálica, que aumentariam o risco para o desenvolvimento de transtornos do neurodesenvolvimento, como o autismo¹²⁸.

Os transtornos do neurodesenvolvimento são um conjunto de condições relacionadas ao desenvolvimento atípico do cérebro durante sua maturação, que determinam um grau variado de dificuldades na adaptação, comunicação social e/ou na realização de atividades básicas de sobrevivência, sendo a prevalência estimada em 7% na população pediátrica^{200, 201}. Esse grupo de transtornos inclui deficiência intelectual, distúrbios da comunicação, TEA, transtorno do *déficit* de atenção com hiperatividade, transtornos específicos de aprendizagem e transtornos motores²⁰⁰. O TEA é um transtorno de alta complexidade, caracterizado por gravidade fenotípica, capacidade social prejudicada, *déficits* comunicativos verbais e não verbais e comportamentos estereotipados²⁰¹.

Atualmente, a etiologia do TEA permanece desconhecida; no entanto há hipóteses de que estaria mais ligado respostas imunes gestacionais e perinatais desreguladas, assim como a etiologia genética complexa e altamente heterogênea, e os fatores pós-natal (como parto, estresse, dieta ou tratamento antibiótico)^{128,202} estão associados a uma modificação da composição da microbiota intestinal, perturbando o eixo microbiota-intestino-cérebro^{203,204}. O risco de TEA está associado principalmente a eventos desfavoráveis no segundo e terceiro trimestre da gravidez, quando as conexões entre os neurônios se estabelecem^{205,206}.

Modelos animais demonstram que a AIM, após uma infecção viral durante a gravidez, esteve associada à prole com uma maior frequência de sintomas centrais de TEA^{131,207}. Esses modelos produzem desregulação imunológica permanente na prole, sendo que a intensidade e o período gestacional em que ocorre a AIM pode influenciar a manifestação dos sintomas²⁰⁸.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017), a prevalência do transtorno teve um aparente aumento, estimando-se atualmente um caso de TEA

em cada 68 crianças; no entanto, ainda não se sabe por que a incidência de autismo aumentou rapidamente durante a década de 1990, bem como por que ainda está aumentando nos anos 2000. Possíveis explicações possíveis para esse aparente aumento da prevalência, incluindo maior conscientização, ampliação de critérios diagnósticos, melhores ferramentas diagnósticas e melhor comunicação. Quase um terço das crianças com TEA também tem deficiência intelectual, o que determina uma maior deterioração em sua funcionalidade, sendo que a combinação de autismo com deficiência intelectual resulta em elevado custo social e à gestão pública²³. Finalmente, a predominância do TEA é maior no sexo masculino, o que apontando para um fator protetor feminino²⁰⁹.

Nos modelos animais de TEA, os filhotes de fêmeas prenhas com infecção durante a gravidez apresentam alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes aos sintomas de TEA em humanos^{210,211}. Os prejuízos mais comumente associados são epilepsia, distúrbios do sono ou ansiedade e depressão. Deficiência intelectual, disfunções sensoriais e *déficits* de atenção, bem como problemas gastrointestinais e deficiência imunológica; estes achados em estudos recentes ganharam alta relevância para encontrar uma explicação para o autismo²¹².

Outros sintomas comuns no TEA são os cognitivos, sendo que essas crianças apresentam dificuldades de atenção²¹³ e, interessante, sabe-se que pacientes com TEA que sofrem de comorbidades gastrointestinais apresentam um maior risco de apresentarem alterações de comportamento^{214,215}. Indivíduos autistas mostram uma mudança na estabilidade, diversidade, composição e/ou metabolismo das bactérias intestinais^{216,217} e, concomitantemente, ocorre progressão da doença do SNC e na sintomatologia comportamental²¹⁸.

A microbiota intestinal se mostra capaz de modular a emoção, a motivação e as funções cognitivas mais elevadas. Além disso, crianças com TEA que apresentam constipação funcional têm sido associadas a sintomas comportamentais agravados, bem como a um aumento no cortisol, no estresse, na ansiedade, assim como convulsões e distúrbios do sono²¹⁹; esses indivíduos parecem ter mais diversidade bacteriana, com menor abundância daquelas que são potencialmente benéficas, como o gênero *Bifidobacteria*. Também foi observado um aumento significativo na relação Firmicutes/Bacteroidetes em indivíduos autistas em relação a indivíduos neurotípicos²²⁰. Ocorre ainda aumento de Bacteroidetes e Proteobactérias e

diminuição de Firmicutes e Actinobacteria em crianças autistas, bem como um aumento em *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. e *Clostridium* spp.²²¹. Existem ainda evidências de que crianças autistas com disfunção gastrointestinal apresentam respostas imunes inflamatórias elevadas e disbiose associada^{222,223}. Um ensaio clínico que envolveu transplante de microbiota intestinal (TMI) em 18 crianças com TEA levou a melhora dos sintomas gastrointestinais e comportamentos relevantes, com aumentos de *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Desulfovibrio*²⁰⁰.

A partir destas observações, existe a hipótese de que a microbiota possa ser considerada como um alvo terapêutico para o TEA. Em sua revisão, Li Q e Zhou J-M observaram uma redução significativa da ansiedade em crianças com TEA que receberam cepas de *Bacteroides fragilis*²⁰⁰. Kang e colaboradores (2017) mostraram a eficácia potencial de uma terapia de transferência de microbiota em 18 pacientes que apresentaram escores significativamente menores de sintomas gastrointestinais e sintomas de TEA após o tratamento²⁰⁰. Em crianças com TEA, outro estudo registrou que oito semanas de tratamento com vancomicina oral levaram a grandes melhorias nos sintomas gastrointestinais e nos sintomas de TEA, embora os benefícios tenham sido perdidos poucas semanas após a interrupção do tratamento²²⁶. Embora até o momento tenha havido um grande progresso no desenvolvimento de suporte comportamental e psicológico para indivíduos com TEA, não existe ainda terapia medicamentosa aprovada para os principais sintomas. O tratamento medicamentoso estabelecido atualmente visa reduzir padrões simultâneos, como aumento da irritabilidade; assim, considerando a natureza heterogênea dessa condição, o desenvolvimento de uma terapia médica segura e eficaz se torna um desafio²².

1.1.5 TMI no transtorno do espectro autista

O TMI é o processo de transplantar fezes de um doador saudável para o intestino do receptor, a fim de recuperar a flora intestinal prejudicada. Sua primeira aplicação na medicina contemporânea foi registrada no ano de 1958, quando Ben Eiseman infundiu material fecal em quatro pacientes com colite pseudomembranosa²²⁷. Após essa experiência pioneira, foi efetivamente utilizado no tratamento de várias doenças, incluindo infecção recorrente por *Clostridium difficile* e

doença inflamatória intestinal¹⁷. Alguns estudos de revisões sistemáticas com metanálises e ensaios clínicos randomizados destacaram a eficácia do TMI no tratamento das infecções recorrentes por *C. difficile*. Foi relatado também que o transplante melhorou a função sexual em pacientes com doenças de Crohn, fortalecendo a conexão entre microbiota intestinal e depressão/humor²²⁸.

A remodelação da microbiota intestinal através do TMI não apenas recupera a função digestiva, mas também melhora o cérebro e o comportamento, podendo ser usado no tratamento de muitas doenças cerebrais, como o TEA, Síndrome de Tourette e epilepsia²⁰⁰. Essa terapia geralmente envolve apenas uma dose para infecção por *C. difficile* e outras condições gastrointestinais, embora haja um interesse crescente no uso de várias doses²²⁹. O tratamento da microbiota intestinal pode ser feito também pelo uso de prebióticos e probióticos. Os prebióticos podem beneficiar tanto a mucosa intestinal quanto a imunidade sistêmica, porque atingem o intestino grosso e estimulam o crescimento da microbiota intestinal benéfica. Os probióticos podem restaurar a permeabilidade intestinal, melhorando a função da barreira mucosa; no entanto, alguns autores registraram efeitos prejudiciais com o uso desta intervenção^{230,231}. Com relação ao seu uso frente aos sintomas do TEA, apenas melhorias temporárias dos sintomas foram relatadas, enquanto obteve-se resultados inconclusivos em estudo que avaliou a microbiota e realizou acompanhamento a longo prazo²³².

Diante do exposto, observa-se que as infecções intestinais e os sintomas comportamentais do TEA podem derivar, pelo menos em parte, da disbiose da microbiota intestinal, bem como que o TMI pode efetivamente reequilibrar esta flora e influenciar na sintomatologia desta doença e de outras patologias humanas²³³. Ainda, modelos animais que utilizam camundongos são importantes para estudar o papel e o funcionamento de intervenções como o TMI²³³⁻²³⁵, mas apesar disso, o possível efeito do TMI sobre o desenvolvimento e evolução do TEA na prole de camundongos fêmeas submetidas à AIM durante a gestação ainda não foi explorado. Estudos dessa natureza são importantes uma vez que ecossistemas microbianos complexos, como o do intestino humano, são difíceis de imitar e apenas cultura de células não é o suficiente para que haja o maior entendimento sobre o sistema imunológico e subsequentemente sobre o cérebro e o comportamento. Entender a possibilidade de

modular o eixo da microbiota-intestino-cérebro como uma ferramenta terapêutica pode ser uma maneira eficaz e promissora de melhorar os sintomas desta doença.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da AIM e o possível benefício do TMI, isoladamente ou em associação com antibiótico, sobre parâmetros comportamentais relacionados ao TEA em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Na prole de camundongos fêmeas que foram submetidas ou não à AIM e que receberam TMI, isoladamente ou em associação com antibiótico, pretende-se:

- Avaliar o comportamento relacionado à ansiedade aos 28 dias após o nascimento;
- Investigar os movimentos estereotipados aos 28 dias após o nascimento;
- Examinar a sociabilidade aos 28 dias após o nascimento.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo pré-clínico com delineamento experimental.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Neste estudo foi utilizado tampão fosfato salina (Laborclin, Brasil); lipopolissacarídeo (Sigma-Aldrich, Escherichia coli 0111:B4 - Brasil); antibiótico (metronidazol– Teuto, Brasil); caixa de teste campo aberto (marcenaria local, Brasil); caixa três câmaras de interação social (mercearia local; Brasil) balança digital (Powner, Brasil); balança de precisão (Shimadzu – AUY220, Brasil); centrífuga refrigerada (Solab Científica, Brasil).

3.3 ANIMAIS

No estudo foram utilizados camundongos adultos machos e fêmeas da linhagem (C57BL/6), pesando entre 20 e 23 g, com 60 dias de vida, provenientes do biotério de criação da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) que não possuíam qualquer anormalidade anatômica, funcional e/ou doenças e machucados. Estes animais foram acasalados para posteriormente avaliar a prole.

Os casais e suas proles foram mantidos no biotério experimental do LaNEx-UNISUL e acondicionados sob regime cíclico de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (6h00min às 18h00min). A limpeza das caixas moradia foi realizada duas vezes por semana, enriquecidas com rolinhos de papelão e livre acesso a comida e água. O ambiente foi mantido a temperatura de $22 \pm 2^{\circ}$ C. Os animais foram aclimatados aos laboratórios por pelo menos 1h antes dos procedimentos, que foram realizados entre 8h00min e 12h00min.

O número de animais por grupo foi calculado em $n= 8$. A fórmula empregada para o cálculo foi a equação $n/grupo=2[(Z\alpha/2 + Z\beta) X d/\Delta]^2$.¹⁹³, para comparação de duas médias, considerando-se o poder de teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio padrão de 12,5% a partir de registros de estudos anteriores e o valor da

diferença a ser detectada igual a 18%. Entende-se, portanto, que o número de pelo menos 8 animais deve ser utilizado em cada grupo experimental para garantir que as conclusões dos experimentos sejam válidas, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas existam, nem tão pouco estar observando diferenças onde elas não existam.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Inicialmente os animais foram acasalados e mantidos em sua caixa moradia durante o ciclo escuro na proporção de uma fêmea para cada macho. No dia seguinte, foi avaliada a presença ou não de um plugue vaginal. Em caso positivo de plugue vaginal, este dia foi definido como dia 0 gestacional (G0) onde as fêmeas foram separadas em grupo controle (PBS) e experimentais (LPS) submetidas ou não a intervenção do TMI. Grupos representados no quadro seguinte:

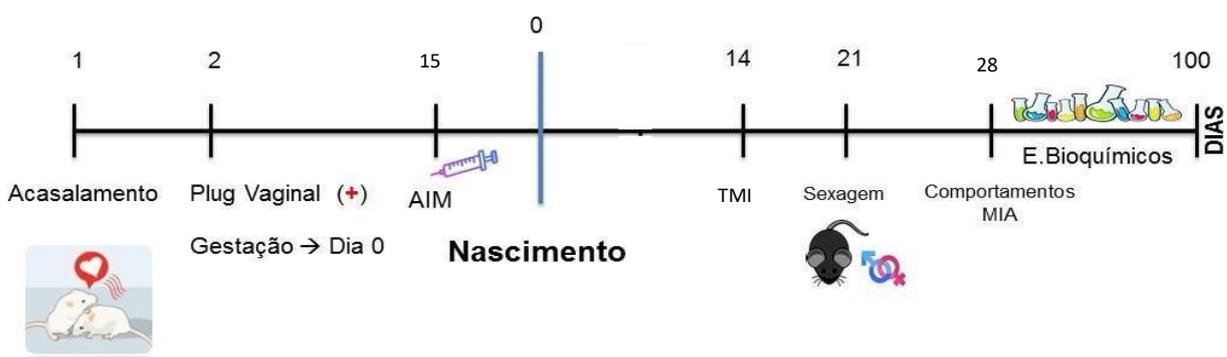
Quadro 1 - Grupos.

| | | | | |
|-----|--------------|-----------------|----------------|------------|
| PBS | PBS – t. PBS | PBS – ANT+t.PBS | PBS – ANT+t.MI | PBS – t.MI |
| LPS | LPS – t. PBS | LPS – ANT+t.PBS | LPS – ANT+t.MI | LPS – t.MI |

No 15º dia gestacional (definido como G15), a AIM foi induzida nas fêmeas com a injeção i.p de LPS (*Escherichia coli* O:111 B4, Sigma). O LPS foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em uma concentração de armazenamento de 150 µg/mL. Para induzir ao modelo de AIM em camundongos, foi administrado 100µg/kg de LPS em 100 µL de PBS. O mesmo volume equivalente de PBS foi injetado nos animais do grupo controle. Os animais foram monitorados diariamente após a injeção de LPS para verificação de sinais de hemorragia vaginal, perda de peso ou comportamento doentio, como aumento da temperatura e imobilidade. O dia do nascimento dos animais foi definido como P0. Quando os animais completaram 14 dias de vida, a prole foi submetida ao TMI. Os animais retornaram para suas caixas moradias e ao completarem 28 dias, foram submetidos aos testes comportamentais e em seguida a morte indolor assistida (MIA), recebendo injeção de uma dose excessiva de anestésico, de acordo com a resolução 1000 de

12/05/2012– Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), sob a supervisão do médico veterinário responsável, para análise bioquímica pós transplante. O encéfalo foi dissecado e armazenado em -80°C para posterior análise.

Figura 1. Desenho experimental



3.4.1 Protocolo de TMI:

Para a coleta das fezes, animais saudáveis foram alocados em uma caixa esterilizada para que, de forma espontânea, o pesquisador pudesse colher o material. Posteriormente, para cada 1 grama de fezes foi adicionado volume de 10 ml de PBS estéril e a mistura foi centrifugada por 5 min a 12.000 r.p.m em uma temperatura de 4°C , gerando um sedimento que foi administrado ao animal, uma única vez, por gavagem oral. O TMI foi realizado na prole com 14 dias de vida. Esse método foi desenvolvido por Li Ming e colaboradores (2015) e adaptado para nosso laboratório^{236,237}.

3.4.2 Tratamento com antibiótico

O metronidazol (comprimidos de 500 mg) foi dissolvido, imediatamente antes do uso, em solução salina a uma concentração de 10 mg/ml e desta administrou-se 0,1 ml para cada 10g de peso do animal, correspondendo a uma dose de 100 mg/kg. O mesmo volume de PBS (0,1 ml para cada 10g de peso do animal) foi injetado nos animais do grupo controle. A administração por via oral foi realizada dois dias antes do TMI usando agulha de gavagem acoplada a uma seringa de 1 ml (Instech Laboratories, Inc., PA, EUA)^{238,239}.

3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

Os testes foram realizados entre as 8h e 12h em uma sala devidamente preparada para este fim. Durante os experimentos, os animais foram transportados para a sala de comportamento uma hora antes dos testes para aclimação e o registro das variáveis foi realizado por um único avaliador.

3.1.1 Comportamento relacionado à ansiedade

Este teste foi realizado em um aparato chamado campo aberto, consistindo numa caixa plástica medindo 40 x 60 e paredes de 50 cm de altura sendo 3 paredes de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 16 quadrados de igual tamanho, desenhados para fazer a marcação dos quadrantes a serem cruzados pelo animal. O comportamento de ansiedade foi avaliado por um único observador, de duas maneiras. Primeiro, registrou-se o número de vezes que cada animal cruzava um quadrante com as quatro patas, nas regiões do centro ou da periferia¹⁹⁷ e, em segundo lugar, registrou-se o tempo (em s) que cada animal dispndia nos quadrantes referentes à região do centro ou nos quadrantes da região da periferia do campo aberto²⁴⁰.

3.5.2 Avaliação de movimentos estereotipados

Os movimentos estereotipados são definidos como movimentos rápidos e repetitivos da cabeça e do antebraço. Os comportamentos avaliados foram farejar (*sniff*), movimentos de autolimpeza (*grooming*) e de roer unhas. Para execução do teste, os animais foram colocados individualmente na caixa de avaliação, onde foram feitas seis observações de 1 min cada, em intervalos de 10 min, por um período total de 1 h, registrando-se o número de vezes que o animal apresentou cada um dos três tipos de movimentos²⁴¹.

3.5.3 Avaliação de sociabilidade

A análise de interação social nos animais foi baseada na tendência natural dos roedores investigarem com maior dedicação um indivíduo intruso que lhe foi apresentado pela primeira vez. No teste com 3 câmaras, inicialmente o animal teste foi colocado na câmara do meio para permitir que ele explorasse o ambiente por 5 min; na sequência, após este período de habituação, outro animal desconhecido do mesmo sexo e mesma faixa etária foi colocado dentro de uma pequena gaiola de arame em uma das câmaras laterais. Para confirmar que o tempo gasto na câmara contendo o animal estranho refletia o comportamento social, o número e o tempo (em s) de contatos com a gaiola vazia (sem animal, S/A) e da gaiola com o animal estranho (C/A) estranho foram registrados por um observador humano. As razões de interação social foram determinadas como: tempo (em s) na zona de interação com o animal / tempo (em s) na zona de interação sem o animal^{240,242}.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

| Variáveis | Tipo | Natureza | Proposta de utilização |
|------------------|--------------|----------------------------------|---|
| AIM | Independente | Qualitativa nominal dicotômica | SIM ou NÃO |
| TMI | Independente | Qualitativa nominal dicotômica | SIM ou NÃO |
| Ansiedade | Dependente | Quantitativa Ordinal Discreta | Número de cruzamentos no centro ou na periferia |
| Ansiedade | Dependente | Quantitativa Ordinal Discreta | Tempo de cruzamentos no centro ou na periferia |
| Interação social | Dependente | Quantitativa Ordinal Discreta | Número de contatos |
| Interação social | Dependente | Quantitativa Ordinal Discreta | Tempo de contato (em s) |

| | | | |
|---------------------------|------------|----------------------------------|--------------------------|
| Movimentos estereotipados | Dependente | Quantitativa Ordinal Discreta | Número de comportamentos |
|---------------------------|------------|----------------------------------|--------------------------|

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados primeiramente quanto ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. No caso de paramétricos os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média e a comparação entre os grupos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido de Tukey. Para os dados não-paramétricos os resultados foram apresentados como mediana e desvio interquartil e a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando o valor de $P \leq 0,05$.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os procedimentos do estudo foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório e com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) descritos na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Experimentais (Protocolo:20.032.4.01.V.) da UNISUL.

4. ARTIGO(S)

A seguir está inserido o resumo do artigo científico fruto desta tese de Doutorado, que foi submetido para a revista científica *Molecular Neurobiology*, com Qualis Capes (Med I-II) A1 em 2023.

Site: <https://www.springer.com/journal/12035/submission-guidelines>

**EFEITOS DO TRANSPLANTE DE MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE
PARÂMETROS COGNITIVOS NA PROLE DE UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE
AUTISMO**

Letícia Ventura¹, Viviane Freiburger¹, Gustavo de Bem Silveira², Paulo Silveira², Anna Paula Piovezan¹, Clarissa Martinelli Comim¹

¹Laboratório de Neurociência Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, SC, Brasil.

²Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Criciúma, SC, Brasil.

*Corresponding author:

Anna Paula Piovezan, Ph.D. Laboratory of Experimental Neuroscience, University of South Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil; E-mail: anna.piovezan@animaeducacao.com.br; Telefone: +55 48 32191167.

RESUMO

A exposição a ativação imune durante a gestação a algum agente ambiental, como o lipopolissacarídeo (LPS) pode levar ao aumento do risco para o surgimento de transtornos do neurodesenvolvimento como de desenvolvimento do transtorno do espectro autista (TEA), caracterizado por déficits nas interações sociais, comunicação, aumento do comportamento ansioso e repetitivo sendo atrelados também quadros de disbiose. A exacerbação de quadros comportamentais do TEA pode estar relacionada a déficits gastrointestinais devido a comunicação de cérebro-intestino, podendo essa via ser utilizada para a modulação do microbioma através do transplante de microbiota intestinal (TMI). Avaliar o efeito da AIM e o possível benefício do TMI sobre parâmetros comportamentais relacionados ao TEA em camundongos. Realizado TMI na prole de fêmeas C57BL/6 que foram submetidas ao protocolo de ativação imune materna no 15º dia gestacional através do LPS. Analisados parâmetros dos comportamentos tipo ansioso, sociabilidade e movimentos estereotipados na prole aos 28 dias de vida. Camundongos descendentes de AIM e que passaram pela intervenção de TMI apresentaram melhora nos parâmetros comportamentais dos testes propostos, diferente da prole sem intervenção. Dados demonstram que a modulação da microbiota intestinal foi benéfica aos receptores TEA, sinalizando através da modulação da microbiota intestinal um potencial tratamento para o TEA

Palavras-chave: Comportamento; Disbiose; Microbioma Intestinal; Transplante de Microbiota Fecal; Transtorno do Espectro Autista.

ABSTRACT

Exposure to immune activation during pregnancy to an environmental agent, such as lipopolysaccharide (LPS) may lead to an increased risk for the emergence of neurodevelopmental disorders such as the development of autism spectrum disorder (ASD), characterized by deficits in social interactions, communication, increased anxious and repetitive behavior, which are also associated with dysbiosis. The exacerbation of ASD behavioral conditions may be related to gastrointestinal deficits due to brain-gut communication, and this pathway can be used to modulate the microbiome through intestinal microbiota tranplantation (IMT). To evaluate the effect of AIM and the possible benefit of IMT on behavioral parameters related to ASD in mice. IMT was performed on the offspring of C57BL/6 females that were submitted to the maternal immune activation protocol on the 15th gestational day through LPS. Parameters of anxious behavior, sociability and stereotyped movements in the offspring at 28 days of life were analyzed. Mice descended from AIM and that underwent the IMT intervention showed improvement in the behavioral parameters of the proposed tests, different from the offspring without intervention. Data demonstrate that the modulation of the intestinal microbiota was beneficial to ASD receptors, signaling through the modulation of the intestinal microbiota a potential treatment for ASD.

Keywords: Behavior; Dysbiosis; Gut microbiome; Fecal Microbiota Transplantation; Autistic Spectrum Disorder.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados do presente estudo é possível observar que o TMI, da maneira avaliada no presente estudo, demonstrou potencial benefício para o tratamento de distúrbios do comportamento do TEA, principalmente relacionados à sociabilidade, ansiedade e estereotipia.

No entanto, novos estudos são necessários no sentido de investigar os mecanismos envolvidos na relação entre a flora intestinal, as respostas imunológicas locais e no SNC que regulam tais comportamentos.

Sugere-se ainda que futuras pesquisas clínicas sejam conduzidas, no sentido de avaliar o possível benefício do TMI em humanos. Tais estudos poderiam investigar quais bactérias intestinais estão mais relacionadas a possíveis benefícios, bem como os níveis de neurotransmissores derivados de intestino, as alterações morfológicas da barreira intestinal e mediadores inflamatórios envolvidos.

REFERÊNCIAS

1. Wallace, B. D., and Redinbo, M. R. (2013). The human microbiome is a source of therapeutic drug targets. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 379–384. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.04.011
2. Limon, J. J., Skalski, J. H., and Underhill, D. M. (2017). Commensal fungi in health and disease. *Cell Host Microbe* 22, 156–165. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.002
3. Manrique, P., Dills, M., and Young, M. J. (2017). The human gut phage community and its implications for health and disease. *Viruses* 9:E141. doi: 10.3390/v9060141
4. Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207–214. doi: 10.1038/nature11234
5. Burcelin, R. M., Serino, M., Chabo, C., Garidou, L., Pomie, C., Courtney, M., et al. (2013). Metagenome and metabolism the tissue microbiota hypothesis. *Diabetes Obes. Metab.* 15, 61–70. doi: 10.1111/dom.12157
6. Sandoval-Motta, S., Aldana, M., Martinez-Romero, E., and Frank, A. (2017). The human microbiome and the missing heritability problem. *Front. Genet.* 8:80. doi: 10.3389/fgene.2017.00080
7. Belkaid Y. Naik S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. *Nat Immunol.* 2013; 14: 646-653
8. Rook G.A., Raison C.L., Lowry C.A. Microbiota, immunoregulatory old friends and psychiatric disorders. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014;817:319–356. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_15.
9. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10:735–742. doi: 10.1038/nrmicro2876.
10. Sharon G., Sampson T.R., Geschwind D.H., Mazmanian S.K. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell.* 2016;167:915–932. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.027.
11. Wassenaar TM, Panigrahi P (2014). Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol* 59: 572–579.
12. Adlerberth I, Wold AE (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 98: 229–238.
13. Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C (2010). Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Curr Opin Biotechnol* 21: 149–156
14. Bauer KC, Huus KE, Finlay BB. Microbes and the mind: emerging hallmarks of the gut microbiota-brain axis. *Cell Microbiol.* 2016;18:632–644. doi: 10.1111/cmi.12585.
15. Erny D., de Angelis A.L.H., Jaitin D., Wieghofer P., Staszewski O., David E., Keren-Shaul H., Mhlahkoi T., Jakobshagen K., Buch T., et al. Host microbiota

constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat. Neurosci.* 2015;18:965–977. doi: 10.1038/nn.4030.

16. Rosenfeld C.S. Microbiome Disturbances and Autism Spectrum Disorders. *Drug Metab. Dispos.* 2015;43:1557–1571. doi: 10.1124/dmd.115.063826.

17. Jiang, H., Ling, Z., Zhang, Y., Mao, H., Ma, Z., Yin, Y., et al. (2015). Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav. Immun.* 48, 186–194. doi: 10.1016/j.bbi.2015.03.016

18. Buttini M, Limonta S, Boddeke HW. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain. *Neurochem Int.* (1996) 29:25–35. doi: 10.1016/0197-0186(95)00141-7

19. Goel R, Bhat SA, Hanif K, Nath C, Shukla R. Angiotensin II receptor blockers attenuate lipopolysaccharide-induced memory impairment by modulation of NF- κ B-mediated BDNF/CREB expression and apoptosis in spontaneously hypertensive rats. *Mol Neurobiol.* (2018) 55:1725–39. doi: 10.1007/s12035-017-0450-5

20. Cryan J. F., Dinan T. G. More than a gut feeling: the microbiota regulates neurodevelopment and behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2015;40(1):241–242. doi: 10.1038/npp.2014.224.

21. Dinan TG, Stanton C, Cryan JF (2013) Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry* 74:720–726

22. Liang, S., Wu, X., Hu, X., Wang, T., and Jin, F. (2018b). Recognizing depression from the microbiota(-)gut(-)brain axis. *Int. J. Mol. Sci.* 19:1592. doi: 10.3390/ijms19061592

23. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample-Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ.* 2018;67(6):1-25. doi: 10.15585/mmwr.ss6706a1

24. Vuong, H. E., Yano, J. M., Fung, T. C., and Hsiao, E. Y. (2017). The microbiome and host behavior. *Ann. Rev. Neurosci.* 40, 21–49. doi: 10.1146/annurev-neuro-072116-031347

25. Santocchi E., Guiducci L., Fulceri F., Billeci L., Buzzigoli E., Apicella F., Calderoni S., Grossi E., Morales M.A., Muratori F. Gut to brain interaction in Autism Spectrum Disorders: a randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. *BMC Psychiatry.* 2016;16:183. doi: 10.1186/s12888-016-0887-5.

26. Iovene M.R., Bombace F., Maresca R., Sapone A., Iardino P., Picardi A., Marotta R., Schiraldi C., Siniscalco D., Serra N., et al. Intestinal Dysbiosis and Yeast Isolation in Stool of Subjects with Autism Spectrum Disorders. *Mycopathologia.* 2017;182:349–363. doi: 10.1007/s11046-016-0068-6.

27. Li Q, Han Y, Dy ABC, Hagerman RJ (2017). The gut microbiota and autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci* 11:120.

- 28.El Aidy S, Dinan TG, Cryan JF. Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. *Front Microbiol* [Internet]. 2013;5(April):3–6. doi:10.3389/fmicb.2014.00146/abstract.
- 29.Borre Y.E., O’Keeffe G.W., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol. Med.* 2014;20:509–518. doi: 10.1016/j.molmed.2014.05.002.
- 30.Petrof, E. O., Claud, E. C., Gloor, G. B., and Allen-Vercoe, E. (2013). Microbial ecosystems therapeutics: a new paradigm in medicine? *Benef. Microbes* 4, 53–65. doi: 10.3920/BM2012.0039
- 31.Young, V. B. (2017). The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *BMJ* 356:j831. doi: 10.1136/bmj.j831
- 32.National Institutes of Health. (2012). NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body. Neonatal levels of cytokines and risk of autism spectrum disorders: An exploratory register-based historic birth cohort study utilizing the Danish Newborn Screening Biobank. *Journal of Neuroimmunology*, 252(1–2), 75–82.
- 33.Ursell L.K., Metcalf J.L., Parfrey L.W., Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr. Rev.* 2012;70(Suppl. 1):S38–S44. doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x]. [PMID: 22861806].
- 34.Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., et al. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–1267. doi: 10.1126/science.1223813
- 35.Sudo, N. (2014). Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut. *Adv. Exp. Med. Biol.* 817, 177–194. doi: 10.1007/978-1-4939-08974_8
- 36.Bik E.M. The Hoops, Hopes, and Hypes of Human Microbiome Research. *Yale J. Biol. Med.* 2016;89:363–373.
- 37.Wampach, L., Heintz-Buschart, A., Hogan, A., Muller, E. E. L., Narayanasamy, S., Laczny, C. C., et al. (2017). Colonization and succession within the human gut microbiome by archaea, bacteria, and microeukaryotes during the first year of life. *Front. Microbiol.* 8:738. doi: 10.3389/fmicb.2017.00738
- 38.Ding H.T., Taur Y., Walkup J.T. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *J. Autism Dev. Disord.* 2017;47:480–489. doi: 10.1007/s10803-016- 2960-9
- 39.Buie T. Potential Etiologic Factors of Microbiome Disruption in Autism. *Clin. Ther.*2015;37:976–983. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.04.001.
- 40.Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2008;134:577–594.
- 41.Bercik P et al (2011) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141(2):599–609, 609 e1–e3

42. Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI (2006). Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 127: 423–433.
43. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma FR, Low SJ, Kim J et al (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18933– 18938.
44. Foster, J. A., Lyte, M., Meyer, E., and Cryan, J. F. (2016). Gut microbiota and brain function: an evolving field in neuroscience. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19:pyv114. doi: 10.1093/ijnp/pyv114
45. Biasucci G., Rubini M., Riboni S., Morelli L., Bessi E., Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum. Dev.* 2010;86(Suppl. 1):13–15. doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004. [PMID:20133091].
46. Huurre A., Kalliomäki M., Rautava S., Rinne M., Salminen S., Isolauri E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. 2008;93(4):236–240. Doi org/10.1159/000111102]. [PMID: 18025796]
47. Principi N., Esposito S. Gut microbiota and central nervous system development. *J. Infect.* 2016;73:536–546. doi: 10.1016/j.jinf.2016.09.010.
48. Grossi E, Melli S, Dunca D, Terruzzi V (2016). Unexpected improvement in core autism spectrum disorder symptoms after long-term treatment with probiotics. *SAGE Open Med Case Rep* 4:2050313X16666231
49. Groer M.W., Gregory K.E., Louis-Jacques A., Thibeau S., Walker W.A. The very low birth weight infant microbiome and childhood health. *Birth Defects Res. C Embryo Today.* 2015;105:252–264. doi: 10.1002/bdrc.21115.
50. Karlsson C.L., Molin G., Cilio C.M., Ahrné S. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term—a pilot study. *Pediatr. Res.* 2011;70(3):282–286. doi 10.1203/PDR.0b013e318225f765]. [PMID:21629156].
51. Bokulich, N. A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., et al. (2016). Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci. Transl. Med.* 8:343ra382. doi: 10.1126/scitranslmed.aad7121
52. Kang D-W, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, Khoruts A, Geis E, Maldonado J, McDonough-Means S, et al. (2017b). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* 5, 10.
53. von Mutius, E. (2017). The shape of the microbiome in early life. *Nat. Med.* 23, 274–275. doi: 10.1038/nm.4299
54. Rook G.A., Lowry C.A., Raison C.L. Hygiene and other early childhood influences on the subsequent function of the immune system. *Brain Res.* 2015;1617:47–62. doi: 10.1016/j.brainres.2014.04.004.

- 55.Parashar, A., and Udayabanu, M. (2016). Gut microbiota regulates key modulators of social behavior. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26, 78–91. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.11.002
- 56.Forsythe P., Sudo N., Dinan T., Taylor V.H., Bienenstock J. Mood and gut feelings. *Brain Behav. Immun.* 2010;24(1):9 16. DOI 10.1016/j.bbi.2009.05.058. [PMID: 19481599].
- 57.Cho, I. e Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Rev Genet.*, 13(4), pp. 260-270.
- 58.Gevers, D. et al. (2012). Bioinformatics for the Human Microbiome Project. *PLoS Comput Biol.*, 8(11), e1002779.
- 59.Egert, M., Simmering, R., and Riedel, C. U. (2017). The association of the skin microbiota with health, immunity, and disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* doi: 10.1002/cpt.698
- 60.Petrof, E. O., Claud, E. C., Gloor, G. B., and Allen-Vercoe, E. (2013). Microbial ecosystems therapeutics: a new paradigm in medicine? *Benef. Microbes* 4, 53– 65. doi: 10.3920/BM2012.0039
- 61.Young, V. B. (2017). The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *BMJ* 356:j831. doi: 10.1136/bmj.j831
- 62.National Institutes of Health. (2012). NIH Human Microbiome Project defines normal bacterial makeup of the body. Neonatal levels of cytokines and risk of autism spectrum disorders: An exploratory register-based historic birth cohort study utilizing the Danish Newborn Screening Biobank. *Journal of Neuroimmunology*, 252(1–2), 75–82.
- 63.Ursell L.K., Metcalf J.L., Parfrey L.W., Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr. Rev.* 2012;70(Suppl. 1):S38–S44. doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x]. [PMID: 22861806].
- 64.Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., et al. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–1267. doi: 10.1126/science.1223813
- 65.Sudo, N. (2014). Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut. *Adv. Exp. Med. Biol.* 817, 177–194. doi: 10.1007/978-1-4939-0897-4_8
- 66.Bik E.M. The Hoops, Hopes, and Hypes of Human Microbiome Research. *Yale J. Biol. Med.* 2016;89:363–373.
- 67.Wampach, L., Heintz-Buschart, A., Hogan, A., Muller, E. E. L., Narayanasamy, S., Laczny, C. C., et al. (2017). Colonization and succession within the human gut microbiome by archaea, bacteria, and microeukaryotes during the first year of life. *Front. Microbiol.* 8:738. doi: 10.3389/fmicb.2017.00738
- 68.Ding H.T., Taur Y., Walkup J.T. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *J. Autism Dev. Disord.* 2017;47:480–489. doi: 10.1007/s10803-016- 2960-9

69. Buie T. Potential Etiologic Factors of Microbiome Disruption in Autism. *Clin. Ther.* 2015;37:976–983. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.04.001.
70. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134:577–594.
71. Schmidt C, Stallmach A. Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2005;51:127–145
72. Arumugam M., et al Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174–180.
73. Garcia-Rodenas CL et al (2006) Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43(1):16–24
74. Uribe A et al (1994) Microflora modulates endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rat. *Gastroenterology* 107(5):1259–1269
75. Butterworth RF (2013) The liver-brain axis in liver failure: neuroinflammation and encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10(9):522–528 19.
76. Lesniewska V et al (2006) Effect on components of the intestinal microflora and plasma neuropeptide levels of feeding *Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium lactis*, and inulin to adult and elderly rats. *Appl Environ Microbiol* 72(10):6533– 6538
77. Bercik P et al (2011) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141(2):599–609, 609 e1–e3
78. Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI (2006). Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 127: 423–433.
79. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma FR, Low SJ, Kim J et al (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18933– 18938.
80. Foster, J. A., Lyte, M., Meyer, E., and Cryan, J. F. (2016). Gut microbiota and brain function: an evolving field in neuroscience. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19:pyv114. doi: 10.1093/ijnp/pyv114
81. Biasucci G., Rubini M., Riboni S., Morelli L., Bessi E., Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum. Dev.* 2010;86(Suppl. 1):13–15. doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004. [PMID:20133091].
82. Huurre A., Kalliomäki M., Rautava S., Rinne M., Salminen S., Isolauri E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. 2008;93(4):236–240. Doi org/10.1159/000111102]. [PMID: 18025796]
83. Principi N., Esposito S. Gut microbiota and central nervous system development. *J. Infect.* 2016;73:536–546. doi: 10.1016/j.jinf.2016.09.010.

84. Roger L.C., McCartney A.L. Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiology*. 2010;156(Pt 11):3317– 3328. doi 10.1099/mic.0.041913-0]. [PMID: 20829292].
85. Favier C.F., Vaughan E.E., De Vos W.M., Akkermans A.D. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68(1):219–226. Doi /10.1128/AEM.68.1.219–226.2002]. [PMID:11772630].
86. Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., et al. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511–521. doi: 10.1542/peds.2005-2824
87. Mayer E.A. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12: 453-466
88. Rook G.A., Lowry C.A., Raison C.L. Hygiene and other early childhood influences on the subsequent function of the immune system. *Brain Res.* 2015;1617:47–62. doi: 10.1016/j.brainres.2014.04.004.
89. Parashar, A., and Udayabanu, M. (2016). Gut microbiota regulates key modulators of social behavior. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26, 78–91. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.11.002
90. Forsythe P., Sudo N., Dinan T., Taylor V.H., Bienenstock J. Mood and gut feelings. *Brain Behav. Immun.* 2010;24(1):9–16. doi 10/1016/j.bbi.2009.05.058. [PMID: 19481599].
91. Cho, I. e Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Rev Genet.*, 13(4), pp. 260-270.
92. Gevers, D. et al. (2012). Bioinformatics for the Human Microbiome Project. *PLoS Comput Biol.*, 8(11), e1002779.
93. Egert, M., Simmering, R., and Riedel, C. U. (2017). The association of the skin microbiota with health, immunity, and disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* doi: 10.1002/cpt.698
94. Man, W. H., de Steenhuijsen Piters, W. A., and Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 259–270. doi: 10.1038/nrmicro.2017.14
95. Murray, P. R. (2000). *Microbiologia medica*, São Paulo: Guanabara Koogan.
96. Humphries, C. (2017). Microbiome: detecting diversity. *Nature* 550, S12–S14. doi: 10.1038/550S12a
97. Claesson, M. J., Cusack, S., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., and de Weerd, H. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4586–4591. doi: 10.1073/pnas.1000097107

98. Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., et al. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* 341:1237439. doi: 10.1126/science.1237439
99. Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486, 222–227. doi: 10.1038/nature11053
100. Diaz Heijtz R. Fetal, neonatal, and infant microbiome: Perturbations and subsequent effects on brain development and behavior. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2016;21:410–417. doi: 10.1016/j.siny.2016.04.012.
101. Callaghan BL, Fields A, Gee DG, Gabard-Durnam L, Caldera C, Humphreys KL, Goff B, Flannery J, Telzer EH, Shapiro M, Tottenham N. Mind and gut: associations between mood and gastrointestinal distress in children exposed to adversity. *Dev Psychopathol* 28: 1–20, 2019.
102. Eisenstein M. Microbiome: bacterial broadband. *Nature* 533: S104 –S106, 2016. doi:10.1038/533S104a
103. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81: e00036-17, 2017. doi:10.1128/MMBR.00036-17.
104. Christian LM, Galley JD, Hade EM, Schoppe-Sullivan S, Kamp Dush C, Bailey MT. Gut microbiome composition is associated with temperament during early childhood. *Brain Behav Immun* 45: 118 –127, 2015. doi:10.1016/j.bbi.2014.10.018.
105. Shulzhenko N, Morgun A, Hsiao W, Battle M, Yao M, Gavrilova O et al (2011). Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nat Med* 17: 1585– 1593.
106. Blakemore SJ, Choudhury S. Development of the adolescent brain: implications for executive function and social cognition. *J Child Psychol Psychiatry* 47: 296 – 312, 2006. doi:10.1111/j.1469-7610.2006.01611.x.
107. Casey BJ, Jones RM, Hare TA. The adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1124: 111–126, 2008. doi:10.1196/annals.1440.010.
108. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication [Correction in *Arch Gen Psychiatry* 62: 768, 2005.]. *Arch Gen Psychiatry* 62: 593– 602, 2005. doi:10.1001/archpsyc.62.6.593.
109. Lee FS, Heimer H, Giedd JN, Lein ES, Šestan N, Weinberger DR, Casey BJ. Adolescent mental health - Opportunity and obligation: emerging neuroscience offers hope for treatments. *Science* 346: 547–549, 2014. doi:10.1126/science.1260497
110. Flannery J, Callaghan B, Sharpton T, Fisher P, Pfeifer J. Is adolescence the missing developmental link in Microbiome-Gut-Brain axis communication? *Dev Psychobiol* 61: 783–795, 2019. doi:10.1002/dev.21821.

111. McVey Neufeld KA, Luczynski P, Dinan TG, Cryan JF. Reframing the Teenage Wasteland: Adolescent Microbiota-Gut-Brain Axis. *Can J Psychiatry* 61: 214 – 221, 2016. doi:10.1177/0706743716635536.
112. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148: 1258–1270.
113. Konturek PC, Haziri D, Brzozowski T, Hess T, Heyman S, Kwiecien S, Konturek SJ, Koziel J. Emerging role of fecal microbiota therapy in the treatment of gastrointestinal and extra-gastrointestinal diseases. *J Physiol Pharmacol* 66: 483–491, 2015.
114. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90:859–904.
115. Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdali R, Kalionis B, Wu J, Wan W, Tai X. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res* 2016: 8426874, 2016. doi:10.1155/2016/8426874.
116. Giunta M, Rigamonti AE, Scarpini E, Galimberti D, Bonomo SM, Venturelli E, Müller EE, Cella SG. The leukocyte expression of CD36 is low in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 28: 515–518, 2007. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.002.
117. Boren E, Gershwin ME. Inflamm-aging: autoimmunity, and the immune-risk phenotype. *Autoimmun Rev* 3: 401–406, 2004. doi:10.1016/j.autrev.2004.03.004.
118. Lencel P, Magne D. Inflammaging: the driving force in osteoporosis? *Med Hypotheses* 76: 317–321, 2011. doi:10.1016/j.mehy.2010.09.023.
119. Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol. Psychiatry* 19, 146–148. doi: 10.1038/mp.2013.65
120. Manderino, L., Carroll, I., Azcarate-Peril, M. A., Rochette, A., Heinberg, L., Peat, C., et al. (2017). Preliminary evidence for an association between the composition of the gut microbiome and cognitive function in neurologically healthy older adults. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 23, 700–705. doi: 10.1017/S1355617717000492
121. Gur, T. L., Worly, B. L., and Bailey, M. T. (2015). Stress and the commensal microbiota: importance in parturition and infant neurodevelopment. *Front. Psychiatry* 6:5. doi: 10.3389/fpsy.2015.00005
122. Ochoa-Repáraz J., Kasper L.H. The microbiome and neurologic disease: Past and future of a 2-way interaction. *Neurotherapeutics.* 2018;15:1–4. doi: 10.1007/s13311-018-0604-9.
123. Fond G, Boukouaci W, Chevalier G, Regnault A, Eberl G, Hamdani N, Dickerson F, Macgregor A, Boyer L, Dargel A, et al. The “psychomicrobiotic”: Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review. *Pathol Biol (Paris)* 2015;63:35–42.

124. Spadoni I, Fornasa G, Rescigno M. Organ-specific protection mediated by cooperation between vascular and epithelial barriers. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(12):761–773. doi: 10.1038/nri.2017.100.
125. Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, Blanchard et, Taylor CM, Welsh DA, et al. obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry*. 2015;77(7): 607–15.
126. König J, Wells J, Cani PD, Garcia-Rodenas CL, MacDonald T, Mercenier A, Whyte J, Troost F, Brummer RJ. Human intestinal barrier function in health and disease. *Clinical and translational gastroenterology*. 2016;7(10):e196. doi: 10.1038/ctg.2016.54.
127. Wells JM, Brummer RJ, Derrien M, MacDonald TT, Troost F, Cani PD, Theodorou V, Dekker J, Meheust A, de Vos WM, et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2017;312(3):G171–G193. doi: 0.1152/ajpgi.00048.2015.
128. London A, Cohen M, Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci* 7: 34, 2013. doi:10.3389/fncel.2013.00034.
129. Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay ME. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol* 595: 1929 –1945, 2017. doi:10.1113/JP272134.
130. Daulatzai MA. Chronic functional bowel syndrome enhances gut-brain axis dysfunction, neuroinflammation, cognitive impairment, and vulnerability to dementia. *Neurochem Res [Internet]*. 2014;39(4):624–44. doi:10.1007/s11064-014-1266-6.
131. Kelly JR, Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Glarke G, Hyland NP. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:392.
132. Huppert J., Closhen D., Croxford A., White R., Kulig P., Pietrowski E., Bechmann I., Becher B., Luhmann H.J., Waisman A., et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*. 2010;24:1023–1034. doi: 10.1096/fj.09-141978.
133. Wekerle H. Gut molecules control brain inflammation. *Nature*. 2018;557:642–643. doi: 10.1038/d41586-018-05113-0.
134. Chen T., Noto D., Hoshino Y., Mizuno M., Miyake S. Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination. *J. Neuroinflammation*. 2019;16:165. doi: 10.1186/s12974-019-1552-y.
135. Barrett E. Ross R.P. O’Toole P.W. et al. Gamma-aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol*. 2012; 113: 411-417
136. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L et al (2015). Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161: 264–276.

137. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012;13:701–712. doi: 10.1038/nrn3346.
138. Sherwin E, Sandhu KV, Dinan TG, Cryan JF. May the force be with you: the light and dark sides of the microbiota–gut–brain axis in neuropsychiatry. *CNS Drugs.* 2016;30:1019–1041. doi: 10.1007/s40263-016-0370-3.
139. Breit S, Kupferberg A, Rogler G, Hasler G. Vagus nerve as a modulator of the brain-gut axis in psychiatric and inflammatory disorders. *Front Psychiatry.* 2018;9 10.3389/fpsyt.2018.00044.
140. Ogbonnaya, E. S., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., Cryan, J. F., and O’Leary, O. F. (2015). Adult hippocampal neurogenesis is regulated by the microbiome. *Biol. Psychiatry* 78, e7–e9. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.12.023
141. Westfall, S., Lomis, N., Kahouli, I., Dia, S. Y., Singh, S. P., and Prakash, S. (2017). Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: deciphering the gut brain axis. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 3769–3787. doi: 10.1007/s00018-017-2550-9
142. Bonaz, B., Bazin, T., and Pellissier, S. (2018). The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Front. Neurosci.* 12:49. doi: 10.3389/fnins.2018.00049
143. Mazzoli, R., and Pessione, E. (2016). The neuro-endocrinological role of microbial glutamate and GABA signaling. *Front. Microbiol.* 7:1934. doi: 10.3389/fmicb.2016.01934
144. Poutahidis T, Kearney SM, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, Ibrahim YM, Chatzigiagos A, Alm EJ, Erdman SE. Microbial symbionts accelerate wound healing via the neuropeptide hormone oxytocin. *PLoS One* 2013;8(10):e78898. doi:10.1371/journal.pone.0078898.
145. Marvel FA, Chen CC, Badr N, Gaykema RPA, Goehler LE. Reversible inactivation of the dorsal vagal complex blocks lipopolysaccharide-induced social withdrawal and c-Fos expression in central autonomic nuclei. *Brain Behav Immun.* 2004;18(2):123–134. doi: 10.1016/j.bbi.2003.09.004
146. Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11:343-53.
147. Berthoud HR, Blackshaw LA, Brookes SJ, Grundy D. Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 16, Suppl 1: 28–33, 2004. doi:10.1111/j.1743-3150.2004.00471.x.
148. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* 352: 539 –544, 2016. doi:10.1126/science.aad9378.
149. Hodes GE, Kana V, Menard C, Merad M, Russo SJ (2015). Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci* 18: 1386–1393.
150. Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res.* 2009;204:313–321

151. Knuesel I, et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature reviews Neurology*. 2014;10:643–660.
152. Estes ML, McAllister AK. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nature reviews Neuroscience*. 2015;16:469–486.
153. Meyer U. Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biological psychiatry*. 2014;75:307–315.
154. Smith S. E. P., Li J., Garbett K., Mirnics K., Patterson P. H. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(40):10695–10702. doi: 10.1523/jneurosci.2178-07.2007
155. Hsiao E. Y., McBride S. W., Hsien S., et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. 2013;155(7):1451–1463. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024.
156. Gupta S, et al. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nat Commun*. 2014;5:5748. doi: 10.1038/ncomms6748.
157. Lankelma JM, Birnie E, TAF W, et al. The gut microbiota as a modulator of innate immunity during melioidosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017. 11(4): e0005548.
158. Huerta PT, Robbiati S, Huerta TS, et al. Preclinical models of overwhelming sepsis implicate the neural system that encodes contextual fear memory. *Mol Med*. 2016. 22.
159. Falck M, Osredkar D, Maes E, et al. Hypothermic Neuronal Rescue from Infection-Sensitized Hypoxic-Ischaemic Brain Injury Is Pathogen Dependent. *Dev Neurosci*. 2017 .
160. Madore C., Leyrolle Q., Lacabanne C., Benmamar-Badel A., Joffre C., Nadjar A., Laye S. Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3, and Microbiota. *Neural Plast*. 2016;2016:3597209. doi: 10.1155/2016/3597209.
161. Atladóttir H. Ó., Thorsen P., Østergaard L., et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2010;40(12):1423–1430. doi: 10.1007/s10803-010-1006-y.
162. Brasil P., Pereira J. P., Jr., Raja Gabaglia C., et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro—preliminary report. *The New England Journal of Medicine*. 2016 doi: 10.1056/nejmoa1602412.
163. Gioula G., Nunes M. L., Zafeiriou D. I. An emerging cause of concern in Europe: zika virus, the developing CNS and the pediatric neurologist. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2016;20(4):497–499. doi: 10.1016/j.ejpn.2016.04.017.
164. Bilbo S. D., Schwarz J. M. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2012;33(3):267–286. doi: 10.1016/j.yfrne.2012.08.006.

165. Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I. N., & Van de Water, J. (2011). Altered T cell responses in children with autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(5), 840–849. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.002>
166. Jones, K.L., Croen, L.A., Yoshida, C.K., Heuer, L., Hansen, R., Zerbo, O., et al. (2017). Autism with intellectual disability is associated with increased levels of maternal cytokines and chemokines during gestation. *Mol Psychiatry* 22, 273– 279.
167. Choi GB, et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 2016;351:933–939.
168. Shin Yim, Y., Park, A., Berrios, J., Lafourcade, M., Pascual, L.M., Soares, N., et al. (2017). Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature* 549, 482–487.
169. Kim, S., Kim, H., Yim, Y.S., Ha, S., Atarashi, K., Tan, T.G., et al. (2017). Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature* 549, 528–532.
170. Lammert, C.R., Frost, E.L., Bolte, A.C., Paysour, M.J., Shaw, M.E., Bellinger, C.E., et al. (2018). Cutting edge: critical roles for microbiota-mediated regulation of the immune system in a prenatal immune activation model of autism. *J Immunol* 201, 845–850.
171. Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C.A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, 57(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>
172. Labouesse M.A., Langhans W., Meyer U. Long-term pathological consequences of prenatal infection: beyond brain disorders. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2015;309:R1–R12. doi: 10.1152/ajpregu.00087.2015
173. Ibi D., Yamada K. Therapeutic Targets for Neurodevelopmental Disorders Emerging from Animal Models with Perinatal Immune Activation. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16:28218–28229. doi: 10.3390/ijms161226092.
174. Alam R., Abdolmaleky H.M., Zhou J.R. Microbiome, inflammation, epigenetic alterations, and mental diseases. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr Genet.* 2017;174:651–660. doi: 10.1002/ajmg.b.32567.
175. Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. *The American Journal of Psychiatry*, 167(3), 261–280.
176. Choi GB, et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 2016;351:933–939.
177. Shin Yim, Y., Park, A., Berrios, J., Lafourcade, M., Pascual, L.M., Soares, N., et al. (2017). Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature* 549, 482–487.
178. Oskvig DB, Elkahloun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of

interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun.* 2012; 26:623-34.

179.Missig G, et al. Perinatal Immune Activation Produces Persistent Sleep Alterations and Epileptiform Activity in Male Mice. *Neuropsychopharmacology.* 2018;43:482-491. doi: 10.1038/npp.2017.243.

180.Hanamsagar R, et al. Generation of a microglial developmental index in mice and in humans reveals a sex difference in maturation and immune reactivity. *Glia.* 2017;65:1504–1520. doi: 10.1002/glia.23176.

181.Machado CJ, Whitaker AM, Smith SE, Patterson PH, Bauman MD. Maternal immune activation in nonhuman primates alters social attention in juvenile offspring. *Biol Psychiatry.* 2015;77:823–832. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.07.035.

182.Skaper, S. D., Facci, L., Zusso, M., & Giusti, P. (2018). An inflammation- centric view of neurological disease: Beyond the neuron. *Frontiers in Cellular Neuroscience,* 12, 72.

183.Garden, G. A., & Möller, T. (2006). Microglia biology in health and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: the Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology,* 1(2), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9015-5>

184.Tilleux, S., & Hermans, E. (2007). Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. *Journal of Neuroscience Research,* 85(10), 2059–2070. <https://doi.org/10.1002/jnr.21325>

185.Abdallah, M. W., Larsen, N., Mortensen, E. L., Atladóttir, H. Ó., Nørgaard-Pedersen, B., Bonfeld-Jørgensen, E. C., ... Hougaard, D. M. (2012).

186.Zerbo, O., Yoshida, C., Grether, J. K., Van de Water, J., Ashwood, P., Delorenze, G. N.,(2014). Neonatal cytokines and chemokines and risk of Autism Spectrum Disorder: The Early Markers for Autism (EMA) study: A case-control study. *Journal of Neuroinflammation,* 11, 113.doi.org/10.1186/1742-2094-11-113

187.Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R et al (2014). Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* 211: 1533–1549.

188.Schafer DP, Stevens B (2015). Microglia function in central nervous system development and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020545.

189.Goines P., Van de Water J. The immune system's role in the biology of autism. *Current Opinion in Neurology.* 2010;23(2):111–117. doi: 10.1097/wco.0b013e3283373514.

190.Mead J., Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunology Letters.* 2015;163(1):49–55. doi:10.1016/j.imlet.2014.11.006.

191.Barrientos RM, Higgins EA, Sprunger DB, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Memory for context is impaired by a post context exposure injection of interleukin-1 beta into dorsal hippocampus. *Behav Brain Res.* 2002; 134(1– 2): 291–298.

192. Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, Gass P, Riva MA, Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8: 430.
193. Xu W, Anderson ME, Kotarba AE, Davis J, Robinson JK, Van Nostrand WE. Cerebral microvascular rather than parenchymal amyloid- β protein pathology promotes early cognitive impairment in transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* (2014) 38:621–32. doi: 10.3233/JAD-130758
194. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil.* (2011) 23:255–64. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x
195. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* (2005) 307:1915–20. doi: 10.1126/science.1104816
196. Jang HM, Lee KE, Lee HJ, Kim DH. Immobilization stress-induced *Escherichia coli* causes anxiety by inducing NF- κ B activation through gut microbiota disturbance. *Sci Rep.* (2018) 8:13897. doi: 10.1038/s41598-018-31764-0
197. Lukiw WJ. *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharide and inflammatory signaling in Alzheimer's disease. *Front Microbiol*(2016) 7:1544. doi: 10.3389/fmicb.2016.01544
198. Solek CM, Farooqi N, Verly M, Lim TK, Ruthazer ES. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev Dyn.* 2018; 247:588-619.
199. Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17:240-51.
200. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM- 5)*. Arlington: American Psychiatric Publishing; 2013.
201. Zablotsky B, Black LI, Blumberg SJ. Estimated Prevalence of Children With Diagnosed Developmental Disabilities in the United States, 2014 -2016. *NCHS Data Brief.* 2017;(291):1-8.
202. Lázaro CP, Pondé MP, Rodrigues LEA, Lázaro CP, Pondé MP, Rodrigues LEA (2016). Opioid peptides and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorders. *Rev Bras Psiquiatr* 38:243–246.
203. Osokine I, Erlebacher A (2017). Inflammation and autism: from maternal gut to fetal brain. *Trends Mol Med* 23:1070–1071
204. Cristiano C, Lama A, Lembo F, Mollica MP, Calignano A, Mattace Raso G (2018). Interplay between peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders: possible nutritional and therapeutic strategies. *Front Physiol* 9:184
205. Ecker C. The neuroanatomy of autism spectrum disorder: an overview of structural neuroimaging findings and their translatability to the clinical setting. *Autism.* 2017;21(1):18–28.

206. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. 2010;20(4):327–48
207. Malkova N V., Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun*. 2012;26(4):607-16. doi: 10.1016/j.bbi.2012.01.011.
208. Careaga M, Murai T, Bauman MD. Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biol Psychiatry*. 2017;81(5):391-401. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.10.020
209. Werling DM (2016). The role of sex-differential biology in risk for autism spectrum disorder. *Biol Sex Differ* 7:58.
210. Edmiston E, Ashwood P, Van de Water J. Autoimmunity, Autoantibodies, and Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*. 2017;81(5):383-90. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.08.031.
211. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*. 2017;23(9):1018-27. doi: 10.1038/nm.4397.
212. Wong H, Hoeffler C. Maternal IL-17A in autism. *Exp Neurol*. 2018;299:228-40. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.04.010.
213. Lyall K, Croen L, Daniels J, Fallin MD, Ladd-Acosta C, Lee BK, et al. (2017). The changing epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health* 38:81–102.
214. Hazen EP, Stornelli JL, O'Rourke JA, Koesterer K, McDougale CJ (2014). Sensory symptoms in autism spectrum disorders. *Harv Rev Psychiatry* 22:112–124.
215. Grossi E, Melli S, Dunca D, Terruzzi V (2016). Unexpected improvement in core autism spectrum disorder symptoms after long-term treatment with probiotics. *SAGE Open Med Case Rep* 4:2050313X16666231
216. Adams, J.B., Johansen, L.J., Powell, L.D., Quig, D., and Rubin, R.A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol* 11, 22.
217. Louis P (2012). Does the human gut microbiota contribute to the etiology of autism spectrum disorders? *Dig Dis Sci* 57:1987–1989.
218. Fung, T.C., Olson, C.A., and Hsiao, E.Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci* 20, 145–155.
219. Sanctuary MR, Kain JN, Angkustsiri K, German JB (2018). Dietary considerations in autism spectrum disorders: the potential role of protein digestion and microbial putrefaction in the gut-brain axis. *Front Nutr* 5:40
220. Li Q, Zhou J-M. The microbiota–gut–brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience* 2016;324:131–9.

- 221.Larroya-García A, Navas-Carrillo D, Orenes-Piñero E (2018). Impact of gut microbiota on neurological diseases: diet composition and novel treatments. *Crit RevFood Sci Nutr* 5:1–15.
- 222.Rose DR, Yang H, Serena G, Sturgeon C, Ma B, Careaga M, et al. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain. Behavior, and Immunity*.2018;70:354–68.
- 223.Luna RA, Oezguen N, Balderas M, Venkatachalam A, Runge JK, Versalovic J, et al. Distinct microbiome-Neuroimmune signatures correlate with functional abdominal pain in children with autism Spectrum disorder. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3(2): 218–30.
- 224.Kang D-W, Adams JB, Gregory AC, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome* 2017:5.
- 225.Li Q, Zhou J-M. The microbiota–gut–brain axis and its potentialtherapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience* 2016;324:131–9.
- 226.Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Vaisanen ML, Nelson MN, Wexler HM. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol*. 2000;15(7):429–435. doi: 10.1177/088307380001500701.
- 227.Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*. 1958;44:854–859.
- 228.Cui B, Feng Q, Wang H, Wang M, Peng Z, Li P, Huang G, Liu Z, Wu P, Fan Z, et al. Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory Crohn’s disease: safety, feasibility, and efficacy trial results. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30:51–58
- 229.Kunde S, Pham A, Bonczyk S, Crumb T, Duba M, Conrad H, Cloney D, Kugathasan S. Safety, tolerability, and clinical response after fecal transplantation in children and young adults with ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*.2013;56(6):597–601. doi: 10.1097/MPG.0b013e318292fa0d.
- 230.Sondergaard B.Olsson J. Ohlson K.et al.Effects of probiotic fermented milk on symptoms and intestinal flora in patients with irritable bowel syndrome: a randomized, placebo-controlled trial.*Scand J Gastroenterol*. 2011; 46: 663-672
- 231.Simren M.Ohman L.Olsson J.et al.Clinical trial: the effects of a fermented milk containing three probiotic bacteria in patients with irritable bowel syndrome—a randomized, double-blind, controlled study.*Aliment Pharmacol her*. 2010; 31: 218-227
- 232.Parracho HM, Gibson GR, Knott F, Bosscher D, Kleerebezem M, McCartney AL. A double-blind, placebo-controlled, crossover-designed probiotic feeding study in children diagnosed with autistic spectrum disorders. *Int J Probiot Prebiot*.2010;5(2):69
- 233.Le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., Prifti E., Hildebrand F., Falony G., Almeida M.,Arumugam M., Batto J.-M., Kennedy S., et al. MetaHIT consortium

(2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546.

234. Manichanh C., Borruel N., Casellas F., Guarner F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 599–608.

235. Russell S. L., Gold M. J., Hartmann M., Willing B. P., Thorson L., Wlodarska M., Gill N., Blanchet M.-R., Mohn W. W., McNagny K. M., et al. (2012). Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* 13, 440–447

236. Li M, Liang P, Li Z, Wang Y, Zhang G, et al. Fecal microbiota transplantation and bacterial consortium transplantation have comparable effects on the re-establishment of mucosal barrier function in mice with intestinal dysbiosis. *Front Microbiol.* 2015; 6:692.

237. Seekatz AM, Theriot CM, Molloy CT, Wozniak KL, Bergin IL, Young VB. Fecal Microbiota Transplantation Eliminates *Clostridium difficile* in a Murine Model of Relapsing Disease. *Infect Immun.* 2015; 83(10):3838-46.

238. Cheng RY, Li M, Li SS, He M, Yu XH, Shi L, He F. Vancomycin and ceftriaxone can damage intestinal microbiota and affect the development of the intestinal tract and immune system to different degrees in neonatal mice. *Pathog Dis.* 2017 Nov 30;75(8). doi: 10.1093/femspd/ftx104. PMID: 28957452.

239. Sizemore CF, Quispe JD, Amsler KM, Modzelewski TC, Merrill JJ, Stevenson DA, Foster LA, Slee AM. Effects of metronidazole, tetracycline, and bismuth-metronidazole-tetracycline triple therapy in the *Helicobacter pylori* SS1 mouse model after 1 day of dosing: development of an *H. pylori* lead selection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 May;46(5):1435-40. doi: 10.1128/AAC.46.5.1435-1440.2002. PMID: 11959579; PMCID: PMC127199.

240. FUNCHAL, C.S; DANI, C. Neurociências: modelos experimentais em animais. 1ª Ed. Porto Alegre, EdIPUCRS, 2014.

241. Silverman JL, Babineau BA, Oliver CF, Karras MN, Crawley JN. Influence of stimulant-induced hyperactivity on social approach in the BTBR mouse model of autism. *Neuropharmacology* 2013;68:210–222.

242. Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav* 2004;3(5):287– 302.

ANEXOS

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



Pró Reitoria Acadêmica - PROAC
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 09 de dezembro de 2020
 Registro na CEUA Nº 20.032.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Clarissa Martinelli Comim Cassol

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Efeitos do transplante de microbiota intestinal precoce em parâmetros cognitivos e neuroquímicos em um modelo pré-clínico de autismo", registrada com o nº 20.032.4.01.IV, sob a responsabilidade de Clarissa Martinelli Comim Cassol- que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta instituição, em reunião de 14 de dezembro de 2020.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgratt
 Coordenador da Comissão

ANEXO B – Produção científica publicada durante o período do Doutorado

2022

Artigo original | [Publicados:19 de fevereiro de 2022](#)

Efeitos do treinamento de baixa intensidade no cérebro e músculo no modelo 1D de distrofia muscular congênita

[Clarissa M. Comim](#) , [Jaime A. Soares](#) , [Adriano Alberto](#)  , [Viviane Freiberger](#) , [Leticia Ventura](#) , [Paula Dias](#) , [Aryadne L. Schactae](#) , [Leoberto R. Grigollo](#) , [Amanda V. Steckert](#) , [Daniel F. Martins](#) , [Rudy J. Nodari Junior](#) , [Mariz Vainzof](#) & [João Quevedo](#)

2021



World Journal of
Clinical Cases

Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

World J Clin Cases 2021 July 16; 9(20): 5358-5371

DOI: [10.12998/wjcc.v9.i20.5358](https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i20.5358)

ISSN 2307-8960 (online)

REVIEW

Obesity in people with diabetes in COVID-19 times: Important considerations and precautions to be taken

Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s12035-021-02482-y>



Swimming Improves Memory and Antioxidant Defense in an Animal Model of Duchenne Muscular Dystrophy

[Priscila Mantovani Nocetti](#)¹ · [Adriano Alberti](#)¹  · [Viviane Freiberger](#)¹ · [Leticia Ventura](#)¹ · [Leoberto Ricardo Grigollo](#)¹ · [Cristina Salar Andreau](#)² · [Rudy José Nodari Júnior](#)³ · [Daniel Fernandes Martins](#)¹ · [Clarissa M. Comim](#)¹

Received: 4 May 2021 / Accepted: 1 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

F1000Research F1000Research 2021, 10:945 Last updated: 21 SEP 2021

 Check for updates

RESEARCH ARTICLE

Dermatoglyphics and abdominal resistance in female children and adolescents: a cross-sectional study [version 1; peer review: awaiting peer review]

Renan Souza ¹, Adriano Alberti ², Gabriel Gastélum Cuadras³, Rodrigo Gomes de Souza Vale⁴, Eliton Marcio Zanon¹, Eloel Benetti Zavorski ¹, Josiane Aparecida De Jesus ¹, Ben Hur Soares⁵, Fabiane Pertille¹, Gracielle Fin¹, Bruna Becker da Silva ², Leoberto R. Grigollo², Aline D. Schlindwein², Viviane Freiburger², Leticia Ventura², Luana Quadros², Ramón Alfonso González Rivas³, Oscar Núñez Enríquez³, Samuel Alfredo Islas Guerra³, Felipe Valenzuela Jurado³, Arturo Iván Chávez Erives³, Arturo Martínez Treviz³, David Arnoldo García Fernández³, Graziela Marques Leão², Clarissa Martinelli Comim ², Rudy José Nodari Junior ^{1,6}

2020

Journal of Molecular Neuroscience
<https://doi.org/10.1007/s12031-020-01565-0>

 Check for updates

Effect of Aerobic Physical Exercise in an Animal Model of Duchenne Muscular Dystrophy

Andreza Hoepers¹ · Adriano Alberti¹  · Viviane Freiburger¹ · Leticia Ventura¹ · Leoberto Ricardo Grigollo¹ · Cristina Salar Andreu² · Bruna Becker da Silva¹ · Daniel Fernandes Martins¹ · Rudy José Nodari Junior³ · Emilio L. Streck⁴ · Clarissa M. Comim¹

Received: 14 October 2019 / Accepted: 22 April 2020
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

> [Acta Neuropsychiatr.](#) 2020 Dec;32(6):321-327. doi: 10.1017/neu.2020.27. Epub 2020 Jul 14.

Involvement of NLRP3 inflammasome in schizophrenia-like behaviour in young animals after maternal immune activation

Letícia Ventura ¹, Viviane Freiburger ¹, Vinicius B Thiesen ¹, Paula Dias ¹, Matheus L Dutra ¹, Bruna B Silva ², Aline D Schlindwein ², Clarissa M Comim ¹

Affiliations [+](#) expand

PMID: 32660670 DOI: [10.1017/neu.2020.27](https://doi.org/10.1017/neu.2020.27)

2019

> [Curr Neurovasc Res.](#) 2019;16(4):358-364. doi: 10.2174/1567202616666191007125502.

Neonatal Immune Activation May Provoke Long-term Depressive Attributes

Simone H Schelder-Marzzani ¹, Paula Dias ¹, Viviane Freiberger ¹, Letícia Ventura ¹, Bruna B Silva ²,
Matheus L Dutra ¹, Franciane Bobinski ³, Aline D Schlindwein ³, Omar J Cassol ¹,
Clarissa M Comim ¹

Affiliations + expand

PMID: 31589124 DOI: 10.2174/1567202616666191007125502

Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1573-7>

Neurocognitive Impairment in mdx Mice



Clarissa M. Comim ¹ · Letícia Ventura ¹ · Viviane Freiberger ¹ · Paula Dias ¹ · Daiane Bragagnolo ¹ · Matheus L. Dutra ¹ ·
Ricardo A. Amaral ¹ · Ana Lucia S. Camargo-Fagundes ² · Patricia A. Reis ³ · Hugo C. Castro-Faria-Neto ³ · Mariz Vainzof ⁴ ·
Maria I. Rosa ²

Received: 14 May 2018 / Accepted: 20 March 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2019, Article ID 9573248, 11 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/9573248>



Research Article

Late Brain Involvement after Neonatal Immune Activation

**Paula Dias, Viviane Freiberger, Letícia Ventura, Daiane Bragagnolo, Matheus L. Dutra,
Verônica V. Horewicz, and Clarissa M. Comim**

*Research Group on Neurodevelopment of Childhood and Adolescence, Laboratory of Experimental Neuroscience,
Postgraduate Program in Health Sciences, University of South Santa Catarina, Palhoça, SC, Brazil*

Correspondence should be addressed to Clarissa M. Comim; clarissamc@gmail.com

Received 12 March 2019; Accepted 7 June 2019; Published 5 August 2019

Guest Editor: Mohan K. M. Karuppan