



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



PO
RICERCA
E INNOVAZ
2014 - 2020



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI ALDO MORO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO DELLA PIANTA E DEGLI ALIMENTI

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DEL SUOLO E DEGLI ALIMENTI

Curriculum: Microbiologia, Tecnologia, Sanità e Chimica degli Alimenti
Ciclo: XXXVI

Titolo Tesi

**SUPPLEMENTAZIONE CON L. REUTERI (ATCC-PTA-6475 e DSM-17938) IN BAMBINI
CON DISTURBO DELLO SPETTRO AUTISTICO: STUDIO RANDOMIZZATO, IN
DOPPIO CIECO, CONTRO PLACEBO**

COORDINATORE:

Chiar.mo Prof. Fabio Minervini

TUTOR:

Chiar.mo Prof. Ruggiero Francavilla

DOTTORANDA:

Dott.ssa Fernanda Cristofori

INDICE

Abstract	1
Abbreviazioni	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. I Disturbi dello Spettro Autistico	3
1.1.1. Background	3
1.1.2. Dati Epidemiologici	3
1.1.3. Criteri diagnostici	4
1.1.4. Ipotesi eziopatogenetiche	5
1.2. Apparato gastrointestinale nei DSA	9
1.2.1. Sintomi gastrointestinali nei DSA	9
1.2.2. Intestino e comportamento	9
1.3. Gut-brain microbiota axis nei DSA	11
1.3.1. Perché studiare l'intestino nei DSA	11
1.3.2. Permeabilità intestinale nei DSA	14
1.3.3. Interazione microbiota, SNC e intestino	16
1.4. Disbiosi intestinale e DSA	18
1.4.1. Composizione microbica nei DSA	25
1.5. Probiotici nei DSA	33
1.5.1. Evidenze cliniche	33
1.5.2. <i>Limosilactobacillus reuteri</i> nei DSA	38
2. STUDIO SPERIMENTALE	40
2.1. Obiettivi dello studio	40
2.2. Materiali e metodi	40
2.2.1. Disegno dello studio	40
2.2.2. Partecipanti	43
2.2.3. Intervento	43
2.2.4. Valutazione comportamentale	44
2.2.5. Valutazione dei sintomi gastrointestinali	47
2.2.6. Raccolta e conservazione dei campioni biologici	47
2.2.7. Analisi del microbiota intestinale	48
2.2.8. Analisi statistica	49
2.2.9. Consenso informato	50
2.3. Risultati	51
2.3.1. Popolazione oggetto di studio	51
2.3.2. Effetti del trattamento con <i>L. reuteri</i> nell'uomo: esiti comportamentali	53
2.3.3. Effetti del trattamento con <i>L. reuteri</i> nell'uomo: valutazione della sicurezza	56
2.3.4. Effetti del trattamento con <i>L. reuteri</i> nell'uomo: profilo del microbioma	56
2.3.5. Effetti di diversi ceppi di <i>L. reuteri</i> sul comportamento sociale: modello murino con ASD.	58
2.4. Discussione	60
2.4.1. Limiti dello studio	61
3. CONCLUSIONE	63
4. BIBLIOGRAFIA	64

Abstract

I disturbi dello spettro autistico (ASD) sono caratterizzati dalla presenza di comportamenti ristretti/ripetitivi e da deficit nella comunicazione sociale. Poiché i trattamenti per l'ASD rimangono limitati, è necessaria lo studio di nuove strategie terapeutiche. Studi preclinici hanno dimostrato che *Limosilactobacillus reuteri* è in grado di invertire selettivamente i deficit sociali in diversi modelli di ASD. In questo studio, in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo, abbiamo testato l'effetto di *L. reuteri* (un prodotto contenente una combinazione dei ceppi ATCC-PTA-6475 e DSM-17938) in bambini con ASD. Il trattamento non ha determinato cambiamenti nella gravità complessiva dell'autismo, nei comportamenti ristretti/ripetitivi, nella composizione del microbioma o nel profilo immunitario. Tuttavia, la combinazione di *L. reuteri* ha prodotto miglioramenti significativi nel funzionamento sociale, generalizzabili su diverse misure. È interessante notare che il ceppo ATCC-PTA-6475, ma non il ceppo parentale DSM-17938, è stato in grado di ripristinare i deficit sociali in un modello preclinico murino di ASD. Complessivamente, i nostri risultati indicano che *L. reuteri* può migliorare il comportamento sociale nei bambini con ASD, sottolineando la necessità di studi su scala più ampia.

Abbreviazioni

Acidi grassi a catena corta, Short Chain Fatty Acid (SCFA)

Acido γ -aminobutirrico, GABA

Adaptive Behavior Assessment System, ABAS

Autism Diagnostic Observational Schedule, ADOS-2

Centers for Disease Control, CDC

Children Behavior CheckList, CBCL

Copy Number Variation, CNV

Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, DSM-5

Disturbi dello Spettro Autistico, DSA

Gastrointestinale, GI

Gastrointestinal Symptoms Rating Scale, GSRS

Limosilactobacillus, L.

Manuale Diagnostico e Statistico dei disturbi mentali, DSM

Repetitive Behavior Scale, RBS

Sistema Nervoso Centrale, SNC

Sistema Nervoso Enterico, SNE
Social Communication Questionnaire, SCQ
Social Responsiveness Scale, SRS
Species, spp.
T helper, Th
T regolatorie, Treg
Unità formanti colonie, CFU
Unità tassonomiche operative, OTU
Visualizzazione e Ragionamento, VR

1. INTRODUZIONE

1.1. I Disturbi dello Spettro Autistico

1.1.1. Background

I Disturbi dello Spettro Autistico (DSA) rappresentano una complessa condizione del neurosviluppo con esordio precoce e un'eziologia multifattoriale. Sono caratterizzati da deficit in due principali ambiti funzionali: (1) compromissione della comunicazione, sia verbale che non verbale, e delle interazioni sociali; (2) presenza di comportamenti, interessi e attività con caratteristiche ripetitive e restrittive. Da tempo, tali disturbi sono oggetto di approfondita indagine nell'ambito della psicopatologia dello sviluppo. Con l'introduzione del DSM-5, i criteri diagnostici sono stati aggiornati e i DSA sono stati inclusi nella categoria dei "Disturbi del Neurosviluppo", che comprende diverse condizioni caratterizzate da alterazioni nelle traiettorie evolutive del sistema nervoso centrale fin dalle prime fasi della crescita. [1]. Una caratteristica peculiare dei Disturbi dello Spettro Autistico (DSA) è la loro elevata frequenza di associazione con altre condizioni patologiche, in particolare di natura psichiatrica, neurologica e gastrointestinale (GI). Si stima che circa il 90% degli individui con DSA presenti almeno una comorbidità. Considerata questa elevata prevalenza, l'attenzione della ricerca si è progressivamente concentrata sulla caratterizzazione dei principali profili di comorbidità. Un aspetto di particolare interesse riguarda l'analisi dei sintomi GI che coesistono con quelli comportamentali, valutando il loro impatto sul funzionamento del bambino e sulla risposta ai trattamenti convenzionali. Tuttavia, la comprensione delle basi eziologiche di queste condizioni rimane oggetto di dibattito e, ad oggi, le opzioni terapeutiche disponibili per la gestione dei sintomi risultano limitate. Questo ha portato a un crescente interesse per lo sviluppo di strategie di intervento innovative, con un'attenzione particolare, negli ultimi anni, alla modulazione del microbiota intestinale come possibile approccio terapeutico.

1.1.2. Dati Epidemiologici

I Disturbi dello Spettro Autistico (DSA) rappresentano una sfida significativa sia dal punto di vista sanitario che sociale, a causa del marcato incremento del numero di diagnosi registrato nei Paesi industrializzati negli ultimi anni. La prevalenza di tali disturbi ha mostrato un aumento progressivo su scala globale nel corso degli ultimi decenni, passando da un'incidenza di circa un caso ogni 5000 individui negli anni '80 a stime attuali sensibilmente più elevate. Questo incremento non può essere attribuito unicamente a una maggiore accuratezza diagnostica o a un'identificazione più precoce del disturbo, come evidenziato da diversi studi epidemiologici. In particolare, un'indagine condotta dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) nel 2014 negli Stati Uniti ha stimato una

prevalenza di un caso ogni 68 bambini di 8 anni. [2], e nel 2018, il CDC ha riportato un tasso di prevalenza di DSA di 1 su 44 [3]. La prevalenza dei Disturbi dello Spettro Autistico (DSA) varia in funzione delle differenze metodologiche adottate negli studi epidemiologici e delle differenze geografiche. Si stima che negli Stati Uniti l'incidenza effettiva superi il 2,5%, mentre in paesi come Danimarca, Finlandia e Svezia si attestano intorno all'1,5%. In Italia, i dati suggeriscono una prevalenza di circa 1 caso ogni 77 bambini di età compresa tra i 9 e i 17 anni. Inoltre, i DSA si riscontrano con una maggiore frequenza nei maschi rispetto alle femmine, con un rapporto di circa 4:1. Tali disturbi non mostrano una distribuzione legata a specifiche aree geografiche o gruppi etnici, essendo stati documentati in popolazioni di ogni origine e contesto socio-economico a livello globale [4, 5].

1.1.3. Criteri diagnostici

I criteri diagnostici dei DSA sono disponibili nel Manuale Diagnostico e Statistico dei disturbi mentali (DSM)-5 della Società Americana di Psichiatria [1], e prevedono deficit persistenti nella comunicazione sociale e nell'interazione sociale in più contesti, come deficit nella reciprocità socio-emotiva (ad esempio, un approccio sociale anomalo; dal fallimento della normale reciprocità della conversazione a una ridotta condivisione di interessi, emozioni o sentimenti; all'incapacità di dare inizio o di rispondere a interazioni sociali); comportamenti comunicativi non verbali utilizzati per l'interazione sociale (per esempio, dalla comunicazione verbale e non verbale scarsamente integrata; ad anomalie del contatto visivo e del linguaggio del corpo o deficit della comprensione e dell'uso dei gesti; a una totale mancanza di espressività facciale e di comunicazione non verbale); e deficit dello sviluppo, mantenimento e comprensione delle relazioni (come difficoltà di adattare il comportamento per adeguarsi ai diversi contesti sociali; alle difficoltà di condividere il gioco di immaginazione o di fare amicizia; all'assenza di interesse verso i coetanei). I bambini con Disturbi dello Spettro Autistico (DSA) manifestano comportamenti caratterizzati da interessi e attività ripetitivi e ristretti, la cui presenza deve includere almeno due dei seguenti aspetti: (a) ripetitività nei movimenti motori, nell'uso degli oggetti o nel linguaggio (ad esempio, stereotipie motorie, allineamento di oggetti, ecolalia, utilizzo di espressioni idiosincratiche); (b) forte resistenza ai cambiamenti, con aderenza rigida a routine e schemi comportamentali ritualizzati, sia verbali che non verbali (ad esempio, disagio marcato in risposta a variazioni minime nell'ambiente, difficoltà nei passaggi da un'attività all'altra, pensiero rigido, rituali specifici nei saluti, necessità di seguire percorsi invariati o di consumare sempre gli stessi alimenti); (c) interessi altamente focalizzati e persistenti, caratterizzati da un'intensità eccessiva o atipica (come attaccamenti insoliti a oggetti specifici o interessi ristretti e ripetitivi); (d) alterata reattività agli stimoli sensoriali, con una risposta esagerata o ridotta agli input ambientali (ad esempio, apparente insensibilità a dolore o variazioni di temperatura, ipersensibilità a

determinati suoni o consistenze tattili, ricerca eccessiva di stimoli sensoriali come annusare oggetti o osservare luci e movimenti in modo persistente). Tali caratteristiche devono manifestarsi precocemente nello sviluppo, risultando generalmente evidenti entro i tre anni di età, e determinare una compromissione clinicamente significativa del funzionamento globale.

1.1.4. Ipotesi eziopatogenetiche

Nonostante l'ampia mole di studi condotti sull'argomento, non è stata ancora individuata un'unica causa che possa spiegare in maniera esaustiva l'eziopatogenesi dei Disturbi dello Spettro Autistico (DSA).

Nel 1943, lo psichiatra infantile Leo Kanner fu il primo a introdurre il termine "autismo" per descrivere una sindrome osservata in un gruppo di 11 bambini. Definita inizialmente come "autismo precoce infantile", questa condizione continua a essere riconosciuta con la stessa denominazione nella sua forma più classica. Nelle sue prime descrizioni, Kanner identificò alcune caratteristiche distintive del disturbo, suggerendo che l'isolamento osservato nei bambini fosse il risultato di un'incapacità innata di comunicare. Tuttavia, analizzando il contesto familiare, ipotizzò inizialmente che il comportamento genitoriale potesse influenzare l'insorgenza del disturbo, per poi in seguito rivedere tale ipotesi.

Parallelamente, lo psichiatra Hans Asperger, in modo indipendente, utilizzò il termine *autistischen psychopathen* per descrivere una condizione osservata in una popolazione infantile caratterizzata da sintomatologia simile a quella descritta da Kanner, ma con abilità cognitive significativamente più sviluppate. Asperger suggerì che il disturbo fosse legato a una compromissione del contatto interpersonale, influenzando profondamente l'affettività e/o l'istinto sociale.

Nei due decenni successivi alle prime descrizioni di Kanner, le teorie psicodinamiche divennero il principale riferimento nello studio dell'autismo. Tra gli studiosi che contribuirono maggiormente a questa prospettiva vi fu Bruno Bettelheim, che elaborò la controversa teoria della "madre frigorifero". Secondo questa ipotesi, il disturbo sarebbe stato il risultato di un'interazione materna caratterizzata da scarso contatto fisico, anomalie nelle pratiche alimentari, difficoltà linguistiche e assenza di contatto visivo, portando il bambino a sviluppare l'autismo come meccanismo di difesa. [6]. Pur mantenendosi ancorato al modello psicodinamico, questo concetto ha subito delle modifiche in risposta alle crescenti evidenze che suggerivano un substrato biologico nei DSA. Il primo autore a sostenere sistematicamente che la causa della sindrome non risiedesse nei genitori, ma che il disturbo avesse una base organica, è stato Rimland [7]. Secondo l'autore, l'autismo deriverebbe da alterazioni morfologiche e funzionali di natura organica, dando origine a un approccio "organicista" volto a identificare le anomalie sottostanti alla sindrome. Nonostante siano stati raccolti numerosi dati a

supporto di questa ipotesi, ad oggi non è stato individuato un singolo elemento distintivo che possa essere considerato caratteristico di tutte le forme di Disturbi dello Spettro Autistico (DSA). Attualmente, si tende a ritenere che l'autismo non rappresenti un'entità clinica unica, bensì un insieme eterogeneo di condizioni con manifestazioni sintomatiche differenti, riconducibili a cause organiche multiple. Vi è tuttavia un ampio consenso sul fatto che l'autismo sia una sindrome comportamentale risultante da un'alterazione dello sviluppo biologicamente determinata, con esordio precoce e origini ancora non completamente chiarite, potenzialmente influenzate da molteplici fattori [8]. I sintomi sono stati attribuiti a notevoli cambiamenti nei processi fisiologici centrali, quali la neuroinfiammazione, la neurotrasmissione, la neurogenesi e la produzione di ormoni prosociali come l'ossitocina e la vasopressina.

La malattia è al momento definita come una malattia complessa con eziopatologia multifattoriale perché sembra essere determinata dal contributo di molti fattori di rischio, come la genetica, l'epigenetica e i fattori ambientali.

1.1.4.1. Genetica

Numerose evidenze indicano i fattori genetici come una delle principali cause dei DSA. L'importanza della componente genetica è supportata dai dati epidemiologici, che evidenziano sia una forte familiarità sia un'alta incidenza del fenotipo autistico in associazione a patologie genetiche di eziologia nota. Si stima che i casi di DSA con una chiara base genetica rappresentino circa il 10-20% del totale dei pazienti diagnosticati. Gli studi di concordanza sui gemelli forniscono ulteriori elementi a sostegno di questa ipotesi. In particolare, la concordanza nei gemelli monozigoti varia tra il 70% e il 90%, mentre nei gemelli dizigoti è significativamente inferiore, oscillando tra lo 0% e il 10% [9]. L'incidenza dei Disturbi dello Spettro Autistico (DSA) tra i fratelli è stimata intorno al 2%, risultando circa 100 volte superiore rispetto alla popolazione generale, in cui il tasso si attesta allo 0,02%. Il rischio di recidiva nelle famiglie con un membro affetto da DSA è significativamente più elevato rispetto alla popolazione di riferimento. In particolare, la probabilità di avere un secondo figlio con diagnosi di DSA varia in funzione del sesso del bambino, con un'incidenza compresa tra il 15% e il 25% nei maschi e tra il 5% e il 15% nelle femmine. Inoltre, la presenza di numerosi parenti di primo grado affetti da DSA fornisce un ulteriore supporto alla rilevanza della componente genetica nell'eziopatogenesi del disturbo [10, 11]. Una percentuale pari al 10% delle diagnosi di DSA riguarda forme che presentano somiglianze con specifiche sindromi genetiche. Al di là delle alterazioni genetiche che determinano quadri sindromici ben definiti, le anomalie genetiche associate ai DSA possono derivare sia da mutazioni in singoli geni sia da variazioni del numero di copie (Copy Number

Variations, CNV). Oltre alle alterazioni genetiche note che portano a fenotipi clinici specifici, sono state identificate varianti genetiche rare, presenti in meno dell'1% della popolazione generale.

Queste mutazioni interessano geni di rilevanza cruciale nei processi di neurosviluppo. Tra le anomalie genetiche più documentate si annoverano le CNV, come microdelezioni e microduplicazioni; mutazioni *nonsense*, che introducono prematuramente un codone di stop, determinando la sintesi di proteine tronche; e mutazioni *missense*, che portano alla produzione di proteine anomale, caratterizzate da perdita di funzione o da un'attività biologica alterata [12].

Tra i geni di particolare rilevanza nelle alterazioni sinaptiche associate ai Disturbi dello Spettro Autistico (DSA) rientrano quelli che codificano per le proteine transmembrana sinaptiche, come le neuroligine 3 e 4 e le neurexine 1 e 3, fondamentali per il corretto funzionamento delle sinapsi.

Un altro gruppo di geni implicati è rappresentato dalla famiglia SHANK (SHANK1, SHANK2, SHANK3), la cui espressione è essenziale per la formazione sinaptica e la maturazione della colonna vertebrale dendritica. In particolare, il gene SHANK3 svolge un ruolo chiave nello sviluppo dendritico ed è coinvolto in un percorso regolatorio con la reelina, una proteina indispensabile per la stabilizzazione e l'organizzazione laminare della corteccia cerebrale [13]. Sebbene il ruolo delle anomalie genetiche sia ampiamente riconosciuto dalla comunità scientifica, numerosi studi hanno evidenziato associazioni significative tra i DSA e diversi fattori di rischio ambientali.

1.1.4.2. Fattori ambientali

Sebbene la biologia molecolare e gli studi sui gemelli abbiano fornito contributi significativi alla comprensione delle basi genetiche dei DSA, la componente genetica da sola non è sufficiente a spiegare l'eterogeneità del disturbo e i meccanismi sottostanti alla sua manifestazione. Un'indagine condotta su coppie di gemelli, sia monozigoti che dizigoti, con diagnosi di DSA ha evidenziato una suscettibilità genetica all'autismo inferiore rispetto a quanto precedentemente stimato negli studi gemellari. [14]. Secondo questo studio, circa il 55% del rischio di insorgenza del DSA è stato associato a fattori di rischio ambientali condivisi tra i gemelli, tra cui l'età avanzata dei genitori, il basso peso alla nascita, la gestazione multipla e le infezioni materne durante la gravidanza. È stato osservato che specifici stimoli ambientali possono influenzare le vie intracellulari nelle fasi iniziali dello sviluppo, determinando modificazioni epigenetiche che impattano la funzione neurale. [15].

Numerosi fattori di rischio ambientale sono stati esaminati negli studi presenti in letteratura, con particolare attenzione al periodo pre- e peri-natale, poiché è in questa fase che il SNC attraversa il suo massimo sviluppo. Tuttavia, non vi è ancora consenso su quali siano i fattori determinanti. Poiché i DSA si manifestano nelle prime fasi della vita, si ipotizza che tali fattori debbano agire precocemente durante lo sviluppo.

Tra i principali fattori di rischio in grado di influenzare il neurosviluppo e determinare alterazioni a lungo termine nella fisiologia del SNC rientrano l'esposizione prenatale a infezioni batteriche o virali (ad esempio, Citomegalovirus e Rubivirus), il contatto con sostanze tossiche ambientali quali pesticidi, ftalati, solventi, inquinanti e metalli pesanti, nonché condizioni di stress, consumo di alcol in gravidanza e dieta materna [16]. È stata inoltre dimostrata un'associazione tra le condizioni materne, come stress e depressione, e il rischio di DSA.

1.1.4.3. Alterazioni funzionali e morfostrutturali

Tra i principali fattori predisponenti dei DSA rientrano le anomalie del neurosviluppo che si verificano durante il primo e il secondo trimestre della vita prenatale [17]. In particolare, è stato osservato che il danno cerebellare, se presente nel periodo perinatale, può incrementare il rischio di sviluppare i DSA fino a 30 volte. Gli studi neuropatologici post-mortem condotti su campioni istologici di SNC prelevati da pazienti autistici hanno evidenziato la presenza di anomalie citoarchitettoniche, con il coinvolgimento di diverse aree cerebrali. Tra queste, sono state documentate una ridotta apoptosi e/o un aumento della proliferazione cellulare, fenomeno particolarmente evidente nei pazienti macrocefalici, alterazioni nei processi di migrazione neuronale e anomalie nella maturazione e differenziazione cellulare [18]. Dal punto di vista funzionale, tali anomalie neuropatologiche contribuiscono alla formazione di una rete neurale atipica, caratterizzata da una ridotta connettività a lunga distanza e da un aumento della connettività locale [19].

Più recentemente, l'attenzione della ricerca si è spostata verso l'ipotesi di un deficit nel funzionamento dei neuroni specchio nei DSA. Questo modello interpretativo mira a spiegare la significativa difficoltà nell'imitazione e nella comprensione empatica osservata nei soggetti con autismo. Sebbene questa teoria offra spunti di grande interesse, sono necessarie ulteriori conferme sperimentali per definirne meglio i meccanismi e le implicazioni cliniche.

1.1.4.4. Alterazioni biochimiche

Si ipotizza che alterazioni quantitative o qualitative a livello recettoriale o nei neurotrasmettitori implicati nel sistema fronto-striatale possano avere un ruolo nella patogenesi dei DSA. In diversi studi è stata riportata la presenza di iperserotoninemia, caratterizzata da livelli elevati di serotonina nel sangue, mentre altre ricerche hanno evidenziato un'alterata funzionalità del sistema dopaminergico. Particolare interesse è stato rivolto all'identificazione di anomalie genetiche correlate al trasportatore mitocondriale per l'aspartato-glutammato [20]. Inoltre, è stato osservato che i soggetti con autismo e i loro familiari presentano con maggiore frequenza polimorfismi associati alla metiltetraidrofolato-reduttasi (MHTFR) e ad altri geni coinvolti nei processi di metilazione, rispetto

alla popolazione generale [21]. Alcuni studi hanno anche riportato livelli elevati di oppioidi nel SNC nei bambini con autismo, suggerendo un possibile deficit nella digestione di proteine come glutine, gliadina e caseina [22].

1.2. Apparato gastrointestinale nei DSA

1.2.1. Sintomi gastrointestinali nei DSA

Per lungo tempo, i disturbi GI nei DSA sono stati sottovalutati o considerati conseguenze di disfunzioni comportamentali e sensoriali associate al disturbo. Il primo studio a segnalare un'elevata incidenza di disturbi GI nei soggetti con DSA risale al 1971 ed è stato condotto da Goodwin e colleghi [23]. Negli ultimi dieci anni, la ricerca su questo tema è notevolmente aumentata, evidenziando generalmente una correlazione tra DSA e sintomi GI. L'incidenza di sintomi GI nei soggetti con DSA appare superiore rispetto alla popolazione a sviluppo tipico, con una prevalenza stimata tra il 9% e il 91% [24]. Tuttavia, non tutti gli studi concordano su questo aumento, e tale variabilità potrebbe dipendere da molteplici fattori, tra cui differenze metodologiche, criteri di valutazione dei sintomi GI e caratteristiche della popolazione studiata, come età, genere e profilo clinico dei soggetti con DSA.

Ad esempio, alcune ricerche focalizzate su patologie specifiche, come la colite ulcerosa e la malattia celiaca, non hanno rilevato differenze significative nell'incidenza di disturbi GI tra bambini con DSA e gruppi di controllo [25]. Al contrario, studi che includono sintomi GI di natura funzionale e idiopatica, basandosi sui resoconti dei genitori e su periodi di osservazione più estesi, tendono a riportare una maggiore prevalenza di tali disturbi nei soggetti con DSA [26].

Una metanalisi condotta su 15 studi ha confermato un'incidenza più elevata di sintomi GI nei bambini con DSA rispetto ai gruppi di controllo a sviluppo tipico. Tra i sintomi più comuni figurano stipsi, dolore addominale e diarrea [27]. Tuttavia, la variabilità dei risultati potrebbe essere attribuita alle caratteristiche cliniche dei campioni analizzati, considerando che nei bambini con DSA e grave compromissione comunicativo-linguistica possono emergere difficoltà nell'espressione dei sintomi GI. Studi più recenti suggeriscono, inoltre, una possibile correlazione tra DSA e disturbi GI, ipotizzando che un'alterazione della flora intestinale possa contribuire, almeno in parte, a questa maggiore prevalenza.

1.2.2. Intestino e comportamento

Recentemente, la ricerca ha rivolto l'attenzione a meccanismi patogenetici che potrebbero coinvolgere simultaneamente più apparati, con un interessamento congiunto del SNC e del sistema GI. L'interazione bidirezionale tra il tratto GI, il microambiente intestinale e il SNC, nota come "asse microbiota-intestino-cervello", svolge un ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi intestinale e neurologica. L'alterazione di questo equilibrio, in presenza di altri fattori predisponenti, potrebbe contribuire alla patogenesi di patologie del sistema nervoso, tra cui i DSA. Tuttavia, ad oggi, i dati relativi all'associazione tra DSA e sintomi GI risultano discordanti. Questa variabilità potrebbe essere attribuita, almeno in parte, a difficoltà interpretative e comunicative nei pazienti, in particolare nei bambini più piccoli, nonché al fatto che i sintomi GI non siano stati inclusi tra i criteri diagnostici dei DSA e, pertanto, non siano stati sistematicamente ricercati con metodologie rigorose. In alcuni casi, inoltre, tali sintomi sono stati erroneamente attribuiti a stereotipie o comportamenti tipici del disturbo. La manifestazione clinica dei sintomi GI nei DSA è estremamente variabile in termini di frequenza e intensità e, analogamente ad altre malattie infiammatorie croniche dell'apparato digerente, non sempre vi è una correlazione diretta con indici infiammatori o marcatori ematici e istologici. I principali meccanismi patogenetici ipotizzati includono infiammazione intestinale, allergie alimentari IgE-mediate o cellulose-mediate, disordini correlati al glutine (malattia celiaca, allergia al grano, sensibilità al glutine non celiaca), ipersensibilità viscerale con dolore addominale funzionale e disautonomia associata a dismotilità e reflusso gastroesofageo [28]. Studi endoscopici hanno evidenziato una maggiore prevalenza di colite aspecifica (nota come enterocolite autistica), iperplasia linfoide e gastrite nei bambini con DSA rispetto ai controlli [29].

Le manifestazioni più frequentemente riportate includono stipsi, diarrea con steatorrea e segni macroscopici di malassorbimento, alvo alternato con stipsi/diarrea, disbiosi intestinale per alterazione del microbiota aerobi/anaerobi, distensione addominale, deficit enzimatici digestivi, reflusso gastroesofageo, vomito alimentare, dolore addominale, megarecto, magrezza patologica con riduzione della massa magra e scarso accrescimento ponderale. Inoltre, è stata osservata una correlazione tra la gravità dei sintomi comportamentali e la presenza di disturbi GI [30]. Uno studio su larga scala condotto da Chaidez et al. su un campione di bambini con autismo, ritardo nello sviluppo o sviluppo tipico ha riportato due evidenze significative: in primo luogo, la frequenza dei sintomi GI era maggiore nel gruppo di bambini con DSA rispetto a quelli con sviluppo tipico; in secondo luogo, i bambini con DSA o ritardo dello sviluppo che presentavano sintomi GI mostravano punteggi più bassi nei parametri di irritabilità, ritiro sociale, stereotipia e iperattività rispetto ai coetanei con sviluppo tipico [31]. Tuttavia, alcune condizioni cliniche, come posture antalgiche addominali peculiari o posizioni evacuative atipiche con aumentato torchio addominale, così come specifiche abitudini alimentari (anoressia o selettività alimentare per consistenza, elevata assunzione

di liquidi, autoriduzione di latticini e/o carboidrati), devono essere attentamente valutate per stabilire se l'origine dei sintomi sia di natura gastroenterologica o neuropsichiatrica.

Evidenze sempre più numerose suggeriscono un ruolo significativo del sistema GI e del microbioma nella modulazione della sintomatologia associata ai DSA.

1.3. Gut-brain microbiota axis nei DSA

1.3.1. Perché studiare l'intestino nei DSA

Già duemila anni fa, Ippocrate affermava che “tutte le malattie iniziano nell'intestino”. L'interesse scientifico per le interazioni tra il SNC e gli organi strettamente correlati è cresciuto notevolmente, stimolato dall'elevata prevalenza di specifiche comorbidità mediche, come i disturbi GI, nei soggetti con DSA rispetto ai loro coetanei a sviluppo tipico.

Negli ultimi dieci anni, il concetto di comunicazione bidirezionale tra intestino e cervello, noto come "asse intestino-cervello", è divenuto un tema centrale della ricerca preclinica e clinica. Numerosi studi hanno indagato il suo possibile ruolo nell'eziopatogenesi di condizioni neuropsichiatriche, tra cui i DSA. Questa interazione bidirezionale tra sistema nervoso e tratto gastrointestinale fornisce un'interpretazione fisiologica di tali condizioni, inserendole all'interno del modello biopsicosociale. Quest'ultimo considera le complesse interazioni tra fattori biologici, psicologici e ambientali nella genesi e nello sviluppo delle malattie. [32].

Il sistema nervoso enterico (SNE) è un'entità ben definita in grado di regolare le funzioni intestinali di mobilità, secrezione e trasporto della mucosa in modo completamente autonomo dal SNC [33]. Come evidenziato da studi su modelli animali, il SNE è in grado di operare autonomamente anche in condizioni di completa denervazione dal SNC. Tuttavia, mantiene un sistema di comunicazione bidirezionale con il SNC, suggerendo un'interazione funzionale continua tra i due sistemi. [33].

Il SNC, dopo aver elaborato e integrato una serie di informazioni relative ai cambiamenti ambientali interni ed esterni, regola il controllo parasimpatico principalmente attraverso il nervo vago. Le efferenze colinergiche di questo sistema modulano l'attività del plesso mienterico, influenzando i movimenti motori, e del plesso di Meissner, regolando la secrezione delle ghiandole submucosali. Parallelamente, il controllo simpatico avviene tramite i nervi splancnici, che determinano una riduzione della motilità intestinale e dell'afflusso sanguigno alla circolazione splancnica. [33]. La pronunciata sinergia e il continuo scambio di informazioni lungo questo asse sono possibili a causa delle vaste risorse neurochimiche a disposizione del SNE. Negli studi in vivo, la stimolazione periferica delle fibre vagali ha dimostrato di portare al rilascio di dopamina nel sistema di ricompensa [34]. Questo tipo di rete neuronale, che collega il tratto GI con diversi livelli del SNC coinvolgendo

le suddette vie neurali, molecole di segnalazione umorale e ormoni [35, 36], è la base funzionale dell'asse intestino-cervello [37].

In particolare, anche l'asse ipotalamico-ipofisi-surrene è coinvolto in questa rete. È responsabile del coordinamento delle risposte adattive del corpo a seguito di eventi stressanti, modulando la composizione del microbiota intestinale e l'integrità della barriera intestinale attraverso la secrezione di norepinefrina e dopamina a livello neuroendocrino. Lo stato di disbiosi risultante e la permeabilità alterata possono indurre la traslocazione di componenti batterici, che promuove la secrezione di ormone adrenocorticotropo, corticosterone, prostaglandine e citochine pro infiammatorie [38].

Prove crescenti hanno dimostrato l'esistenza di una connessione bilaterale complessa e ancora non ben compresa tra microbiota intestinale, intestino e SNC. Negli ultimi anni, poiché le conoscenze microbiologiche e neuroscientifiche sono avanzate e il ruolo svolto dal microbiota intestinale nella fisiologia dell'ospite è diventato più evidente, c'è stato un cambiamento nella concezione dell'asse intestino-cervello e il termine è stato rinominato "asse microbiota-intestino-cervello", come precedentemente citato [39]. In effetti, la comunicazione tra i microbi intestinali e l'asse intestino-cervello avviene attraverso molteplici vie e meccanismi, comprese le vie immunitarie, neurali, metaboliche ed endocrine che arbitrano la segnalazione bidirezionale localmente nell'intestino e perifericamente (Tabella 1) [36, 40].

Tabella 1. Principali meccanismi dell'asse bidirezionale microbiota-intestino-cervello (da Carabotti et al., 2015, mod. [41])

Dal microbiota intestinale al cervello
Sintesi, espressione e catabolismo di neurotrasmettitori (ad es. serotonina, GABA) e di fattori neurotrofici (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> , BDNF)
Protezione della barriera intestinale e dell'integrità delle giunzioni strette
Modulazione degli stimoli sensoriali vagali
Metaboliti batterici
Regolazione dell'immunità a livello della mucosa
Dal cervello al microbiota intestinale
Alterazioni nella produzione di muco e del biofilm
Alterazioni della motilità
Alterazioni della permeabilità intestinale
Alterazioni della funzione immunitaria

Ricerche più ampie hanno inizialmente impiegato modelli animali per studiare la patogenesi dei DSA e il coinvolgimento dei microrganismi in questo processo. Le metodologie più utilizzate includono il confronto della composizione del microbiota intestinale tra soggetti con DSA e controlli sani, l'analisi delle variazioni comportamentali indotte da modulatori del microbiota intestinale nei soggetti affetti e l'introduzione di fattori di virulenza nei controlli per valutare eventuali modifiche fenotipiche.

L'interesse per l'asse microbiota-intestino-cervello è aumentato in particolare in seguito allo studio di Lozupone et al., che ha dimostrato una maggiore attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene in risposta allo stress nei topi privi di microbi rispetto ai topi con microbiota intestinale preservato. [42].

Bravo et al. hanno dimostrato che l'integrazione con *Lactobacillus rhamnosus* può modificare l'espressione del recettore GABA nelle regioni corticali, nell'ippocampo e nell'amigdala, con successiva riduzione dei comportamenti correlati all'ansia e alla depressione e dei livelli di corticosterone indotti dallo stress, suggerendo il coinvolgimento dell'asse neuroendocrino. È interessante notare che questi effetti sono stati invertiti dopo la vagotomia, suggerendo un ruolo cruciale del sistema nervoso periferico nella connessione intestino-cervello [43].

Le interazioni con i microbi intestinali si verificano nella barriera intestinale, che è un'interfaccia essenziale e altamente dinamica tra l'ospite e il mondo esterno costituita da diverse strutture, tra cui molecole di immunoglobuline (Ig) A, peptidi antimicrobici, lisozima e fosfolipasi secretoria A2, cellule epiteliali intestinali e cellule immunitarie adattive (macrofagi, cellule T, cellule B e cellule dendritiche) [36].

La comprensione dei meccanismi che causano disfunzioni nella comunicazione intestino-cervello ha dato contributi essenziali alla comprensione della fisiopatologia di base dell'asse microbiota-intestino-cervello nei pazienti con DSA e ha incoraggiato la proposta di nuove prospettive terapeutiche [44].

In effetti, i microrganismi ospitati nel tratto GI possono modulare l'attivazione delle cellule del sistema immunitario e dell'epitelio intestinale, trasducendo segnali infiammatori o anti-infiammatori al SNE e, di conseguenza, al SNC [45].

Diversi autori hanno ipotizzato che le alterazioni nel microbiota intestinale possano contribuire all'espressione del fenotipo autistico o esacerbare la gravità dei sintomi negli individui geneticamente predisposti ai DSA [46–48].

Infatti, il microbiota ricopre molte funzioni: supporta la digestione dei nutrienti, regola il metabolismo, elabora sostanze pericolose, partecipa alla detossificazione e organizza il controllo del sistema immunitario. La composizione del microbiota è influenzata da molti fattori, tra cui geni, microbioma materno, nutrizione, attività cerebrale e umore. Ciò significa che qualcosa che inizia come un'emozione nel cervello influenza l'intestino e i segnali generati dal microbiota. Questi segnali sono, a loro volta, trasmessi al cervello, spesso rendendo quello stato emotivo più intenso e prolungato [49].

È stato ipotizzato che i DSA possano derivare da qualsiasi interruzione che possa alterare l'equilibrio del microbiota e dell'intestino e che l'interruzione di una singola parte di questo delicato meccanismo possa potenzialmente avere un impatto su qualsiasi anello della catena [50].

Nello studio dell'eziologia dei DSA, è fondamentale considerare alcune caratteristiche distintive dei bambini affetti, poiché queste possono influenzare direttamente la comparsa di disturbi GI. Di conseguenza, l'interpretazione dei risultati delle ricerche in questo ambito richiede particolare cautela. Un aspetto rilevante è l'elevato utilizzo di antibiotici nei bambini con disturbi del neurosviluppo, così come le frequenti restrizioni alimentari presenti nella loro dieta.

In particolare, i soggetti con DSA tendono a seguire un'alimentazione selettiva, limitata a un ristretto numero di alimenti in base a specifiche preferenze. Se protratta nel tempo, questa condizione può determinare una ridotta diversità nell'apporto di nutrienti, con conseguenti alterazioni nella composizione del microbiota intestinale.

Alla luce di questi fattori, l'analisi della microflora intestinale nei soggetti con DSA deve tenere conto delle possibili variabili confondenti che potrebbero influenzare i risultati, al fine di garantire una corretta interpretazione delle evidenze scientifiche.

1.3.2. Permeabilità intestinale nei DSA

La "leaky gut syndrome" si riferisce a una condizione in cui la funzione di barriera epiteliale dell'intestino tenue o crasso risulta compromessa, determinando un aumento della permeabilità intestinale. Questa alterazione consente il passaggio di un numero maggiore di molecole e cellule tra l'intestino e il sistema circolatorio, con potenziali implicazioni per la salute sistemica [51].

La permeabilità intestinale è regolata da un'unità funzionale complessa che include il microbiota intestinale, lo strato mucoso, l'epitelio intestinale, i componenti dell'immunità innata e acquisita, i sistemi ormonali e neuroenterici, il sistema vascolare-linfatico e gli enzimi digestivi. Questa barriera svolge un ruolo cruciale come prima linea di difesa dell'organismo contro sostanze tossiche, antigeni immunogenici e fattori pro-infiammatori, mantenendo un delicato equilibrio tra la carica antigenica presente nel lume intestinale e la complessa struttura della mucosa.

Il corretto funzionamento di questa barriera è essenziale per preservare la salute intestinale e sistemica, prevenire processi infiammatori e modulare la risposta immunitaria. Normalmente, solo una quantità minima di antigeni è in grado di attraversare la barriera intestinale e interagire con il sistema immunitario innato e adattativo. Tuttavia, un'alterazione della sua funzionalità può favorire il transito di batteri e antigeni nel sistema circolatorio, contribuendo allo sviluppo di condizioni

patologiche [52]. Il nucleo della permeabilità intestinale sono le connessioni intracellulari. Queste giunzioni strette comprendono un sistema di numerose proteine nello spazio paracellulare tra ogni cellula nel rivestimento intestinale che sono infatti responsabili della funzionalità della barriera epiteliale. Questa barriera insormontabile ma selettiva è rafforzata da uno spesso rivestimento di muco e interagisce costantemente con il contenuto luminale e i batteri enterici.

È stato evidenziato nella precedente sezione che l'intestino e il SNC hanno una forte relazione e interagiscono regolarmente. I neuropeptidi che consentono la comunicazione bidirezionale tra l'intestino e il cervello includono la sostanza P, il peptide correlato al gene della calcitonina, il neuropeptide Y e il polipeptide intestinale vasoattivo [25]. Il cortisolo, un attore chiave nello sviluppo di ansia e disturbi depressivi, viene anche rilasciato dall'asse ipotalamico-ipofisi-surrene e controlla la motilità intestinale, l'integrità e l'ipersecrezione [38]. Il microbiota intestinale può influenzare in modo sequenziale la funzione del SNC attraverso processi neuronali, endocrini, immunologici e metabolici perché, come già specificato, la comunicazione è bidirezionale [33].

Si presume che la relazione tra l'intestino e il SNC nell'eziologia dei DSA sia una maggiore permeabilità intestinale. Ad esempio, è stato dimostrato che l'iniezione di acido propionico (che è prodotto da batteri intestinali) nel cervello dei ratti [53] provoca neuroinfiammazione e sintomi simili a quelli dei DSA [54]. Questo potrebbe spiegare perché i bambini con DSA hanno peggiorato i sintomi quando esposti a conservanti alimentari contenenti acido propionico. In questo caso particolare, una maggiore permeabilità intestinale consentirebbe all'acido propionico di entrare nel flusso sanguigno e alla fine fuoriuscire nella barriera emato-encefalica.

La permeabilità intestinale impedisce al contenuto intestinale di entrare nel flusso sanguigno e di sopprimere le successive risposte infiammatorie immunologiche e le malattie GI [55]. Di conseguenza, una barriera intestinale intatta diminuisce le risposte infiammatorie. De Magistris et al. hanno dimostrato che il 36,7% dei bambini con DSA ha una permeabilità intestinale aberrante rispetto a meno del 5% dei bambini di controllo [56]. Dati simili sono stati riportati da D'Eufemia et al., che hanno riferito che il 43% dei bambini con DSA con sintomi GI ha una ridotta permeabilità intestinale [57]. Recentemente, per studiare l'associazione tra permeabilità intestinale e comportamento, Teskey et al. hanno misurato la proteina legante gli acidi grassi intestinali come marcatore del danno epiteliale intestinale nel plasma dei bambini con DSA e hanno scoperto che un aumento di questa proteina è correlato a un grave deficit nella comunicazione, nell'interazione sociale e nel comportamento disadattivo [58].

Una comprensione più ampia del ruolo della barriera intestinale nell'autismo potrebbe aiutare notevolmente a prevedere la migliore opzione di trattamento per un dato paziente.

1.3.3. Interazione microbiota, SNC e intestino

Le alterazioni nella composizione del microbiota intestinale possono determinare variazioni nei livelli di molecole neuroattive, tra cui gli acidi grassi a catena corta (SCFA), come l'acido propionico, l'acido acetico e l'acido butirrico, nonché i lipopolisaccaridi. Queste molecole sono in grado di influenzare il SNC attraverso la via endocrina [59]. Studi hanno riportato una sovraespressione di tali composti nei soggetti con DSA [60], anche se i risultati rimangono per lo più contraddittori [61–64].

Studi su modelli animali hanno dimostrato una crescita eccessiva di *Firmicutes*, una riduzione di *Bacteroides spp.* e un aumento dei livelli di acido butirrico nei topi maschi con comportamenti autistici [65, 66]. Diversi studi hanno dimostrato che gli SCFA possono permeare la barriera emato-encefalica [67] e modulare le caratteristiche neurali delle cellule cerebrali [68–70]. Infatti, la somministrazione di acido propionico nei modelli murini, prenatale e nei primi anni di vita [71–74], così l'aumento dell'acido propionico alimentare nei bambini [75], come già citato, hanno facilitato l'insorgenza di comportamenti *autism-like* in tutti gli studi sugli animali e sull'uomo. Gli SCFA delle specie batteriche agiscono su specifiche vie GI e immunitarie, e questo può compromettere la funzione metabolica intestinale e aumentare la risposta immunitaria e la disfunzione mitocondriale, con conseguente aumento dello stress ossidativo. Lo stress ossidativo sostenuto può, a sua volta, migliorare la permeabilità intestinale e aumentare l'infiammazione.

L'attivazione microgliale nel cervello può aumentare ulteriormente l'infiammazione, con conseguente malfunzionamento delle sinapsi e manifestazione di anomalie comportamentali e neuropatologia [76–80].

Come i mammiferi, anche nella *Drosophila*, un'alterazione del microbiota intestinale può causare una esplosione ossidativa epiteliale, causando cambiamenti nella permeabilità intestinale e influenzando la longevità e i comportamenti [81–83].

Il microbiota intestinale può rilasciare metaboliti che possono modulare i livelli di composti psicoattivi nel SNC o produrre queste sostanze neuroattive da sole [36, 84]. Tra i diversi neurotrasmettitori coinvolti nei DSA che sembrano essere regolati dal microbioma ci sono serotonina, glutammato e dopamina [85, 86].

Ad esempio, i lattobacilli e i bifidobatteri sono produttori di acido γ -aminobutirrico (GABA) [85, 87, 88]; *Candida spp.*, *Escherichia spp.*, *Enterococcus spp.* e *Streptococcus spp.* sono produttori di serotonina [87]; *Escherichia spp.* e *Saccharomyces spp.* generano norepinefrina; *Lactobacillus spp.* è un produttore di acetilcolina; e *Bacillus spp.* e *Serratia spp.* sono produttori di dopamina [89]. Inoltre, sono stati rilevati livelli elevati di norepinefrina con maggiori quantità di *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Saccharomyces* o *Streptococcus spp.* nell'intestino [85, 87].

La serotonina è un neurotrasmettitore che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'umore attraverso la sua influenza sulle cellule microgliali nel SNC [90]. Le cellule enterocromaffini distribuite lungo la mucosa intestinale ne producono il 95% [91]. Nello studio di Yano et al., è stato dimostrato che i batteri indigeni che formano spore nel microbiota di topo e umano promuovono la biosintesi della serotonina dalle cellule enterocromaffini e hanno un impatto significativo sulla fisiologia dell'ospite modulando la motilità GI e la funzione piastrinica, suggerendo una segnalazione metabolica diretta dai microbi intestinali alle cellule enterocromaffini [90]. Il microbiota intestinale possiede enzimi che regolano le vie metaboliche del triptofano, portando alla produzione di derivati della serotonina, della chinurenina o dei derivati indolici. Pertanto, controllando la quantità di triptofano, il microbiota può influenzare la quantità di serotonina encefalica [92].

I modelli di iper- e ipo-glutamina in diverse fasi dello sviluppo sono alla base dell'ipotesi di comunicazione dei neurotrasmettitori nella patogenesi dei DSA. Vari studi sugli antagonisti degli NMDAR o AMPAR hanno dimostrato benefici clinici nei DSA [93]. Allo stesso modo, la via eccitatoria del glutammato è probabilmente uno dei fattori coinvolti nell'eziopatogenesi dei DSA. È parte della comunicazione intestino-cervello, in quanto media la segnalazione trans-sinaptica. È anche implicato nell'adesione cellulare, collegando i neuroni pre- e postsinaptici, e modella le reti neurali specificando le funzioni sinaptiche [94]. Inoltre, una correlazione tra i fenotipi di DSA e i livelli di glutammato/glutamina in varie aree cerebrali è stata mostrata attraverso l'uso del neuroimaging in vivo di individui con DSA [93].

Inoltre, la segnalazione alterata della dopamina è stata associata ai DSA sia nei topi che negli esseri umani. Uno studio di Di Carlo et al. ha suggerito che i topi che sono omozigoti per la variante del DNA T356M del gene SLC6A3, che codifica il trasportatore della dopamina, hanno la segnalazione di dopamina alterata e la disfunzione metabolica, pesano meno e hanno ridotto grasso corporeo [95]. Gli autori hanno trovato una significativa diminuzione dell'abbondanza di *Fusobacterium* a livello orale. Inoltre, c'è un'associazione positiva tra l'abbondanza di *Fusobacterium*, una migliore gestione del glucosio e la diminuzione del grasso corporeo [95].

Tuttavia, è improbabile che i neurotrasmettitori prodotti nell'intestino raggiungano il cervello a causa della presenza della barriera ematoencefalica. Una probabile eccezione è il GABA perché i suoi trasportatori sono presenti nella barriera ematoencefalica. Tuttavia, il SNC può essere indirettamente influenzato dai neurotrasmettitori prodotti nell'intestino perché possono agire sul SNE [96, 97].

In effetti, la barriera ematoencefalica è un'altra struttura anatomo-funzionale cruciale dell'asse microbiota-intestino-cervello. Infatti, modula il traffico di molecole specifiche e contribuisce al mantenimento della normale attività neuronale. È anche implicato nelle funzioni immunologiche e protegge il cervello da batteri e molecole microbiche durante la fase di sviluppo del SNC e in età

adulta [98, 99]. Il microbiota intestinale equilibrato è necessario per sviluppare e mantenere una normale barriera ematoencefalica.

Inoltre, sono stati osservati cambiamenti strutturali, tra cui una maggiore attivazione delle cellule microgliali, post-mortem nel cervello di individui autistici [64, 82]. Tutto questo è alla base dell'ipotesi che i DSA siano una condizione causata o almeno accompagnata da un'attivazione immunitaria nel cervello che porta a uno stato neuroinfiammatorio e potrebbe quindi portare a sinapsi malfunzionanti [82]. Nella fase infiammatoria, l'arginina vasopressina viene rilasciata dal cervello, ed è un metabolita noto per agire sul comportamento sociale ed è considerato un biomarcatore per i DSA [82]. Inoltre, c'è un numero ridotto di cellule Purkinje nel cervelletto dei pazienti con DSA [32, 100], che li rende suscettibili alla neurotossina tetanica prodotta da *Clostridium tetani* [100]. Infatti, un'elevata quantità di *Clostridium spp.* è stata trovata in soggetti con DSA, il che potrebbe spiegare la diminuzione delle cellule di Purkinje nel cervelletto di questi soggetti [100].

Attualmente, gli studi clinici volti a indagare la funzione neurologica, i metaboliti associati all'integrità della barriera ematoencefalica, il ruolo del microbiota e la funzione gastrointestinale nel contesto dei DSA risultano ancora limitati. Di conseguenza, non è stato ancora determinato se tali aspetti possano rappresentare target terapeutici efficaci.

1.4. Disbiosi intestinale e DSA

L'ipotesi che la disbiosi intestinale possa avere un ruolo nell'eziopatogenesi dei DSA rappresenta un ambito di studio complesso ma di grande rilevanza. Il microbiota intestinale subisce significative modificazioni dalla nascita fino all'età adulta, e la tempistica della sua colonizzazione è ancora oggetto di dibattito. Evidenze recenti suggeriscono che la colonizzazione microbica intestinale potrebbe avere inizio già prima della nascita, durante la gravidanza, o avvenire attraverso la colonizzazione placentare [101]. Tuttavia, questa ipotesi rimane controversa [102, 103]. Il microbioma fluttua dinamicamente man mano che la dieta e i fattori ambientali si modificano nel corso dello sviluppo [104] (Figura 1).

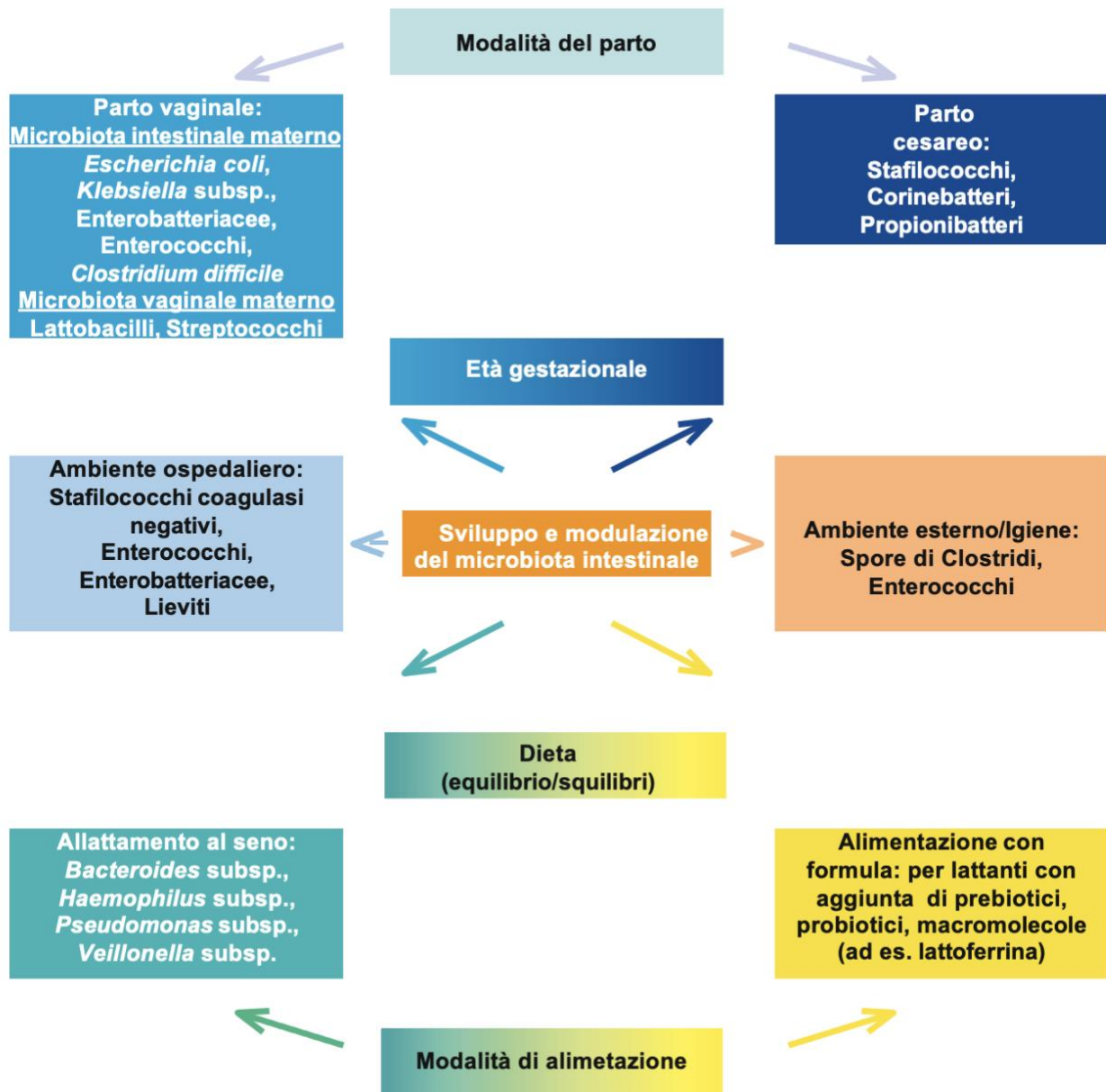


Figura 1. Principali determinanti del microbiota intestinale in età pediatrica (da Putignani et al., 2014, mod.[105]).

Nel complesso, questo trasferimento di agenti microbici al feto può aiutare a plasmare il sistema immunitario, il controllo metabolico e persino gli aspetti comportamentali [106]. Ad esempio, il polisaccaride capsulare A del *Bacteroides fragilis* materno contribuisce alla formazione di cellule T regolatorie (Treg) nella mucosa intestinale del feto, proteggendo dall'infiammazione e migliorando la tolleranza agli antigeni alimentari [107]. Al contrario, la composizione del microbiota materno dipende da varie influenze, come la dieta, l'esposizione agli antibiotici e altri fattori ambientali. Uno studio sui primati ha confermato il ruolo di una dieta materna ricca di grassi nel plasmare il

microbioma intestinale della prole [108]. Inoltre, il consumo materno di probiotici è correlato a un ridotto rischio di parto pretermine [109] e di sviluppo di malattie allergiche nella prole [110]. D'altra parte, il trattamento antibiotico può limitare o alterare l'esposizione del feto ai batteri e ai loro prodotti, causando un'immunità primitiva aberrante.

Nei modelli murini, la terapia antibiotica durante la gravidanza riduce le cellule produttrici di IL-17 e aumenta il rischio di sepsi neonatale [111]. Hsiao et al. hanno riferito che, stimolando il sistema immunitario materno durante la gravidanza, la prole mostra anomalie nel comportamento simile a quelli osservati nei DSA [112]. Inoltre, analizzando il microbiota intestinale e la mucosa intestinale della prole, sono state trovate disbiosi e una maggiore permeabilità intestinale. Tuttavia, l'integrazione probiotica orale con *Bacteroides fragilis* durante lo svezzamento potrebbe migliorare le anomalie comportamentali e la disbiosi [112]. L'attivazione immunitaria materna è anche associata a livelli elevati di IL-6 e IL-17A circolanti [113], che sono coinvolti nella differenziazione delle cellule T helper (Th) 17. Questo è alla base dell'ipotesi che l'effetto del microbiota sulla risposta immunitaria consista nella modulazione per mantenere un adeguato equilibrio tra stati pro-infiammatori e anti-infiammatori mediati rispettivamente dalle cellule Th17 e Treg [114]. Da questo, ne consegue che il microbiota intestinale potrebbe essere coinvolto nell'eziologia multifattoriale dei disturbi cognitivi e comportamentali e nella protezione da essi.

Altri fattori post-natali che modellano la comunità microbica intestinale includono abitudini nutrizionali (allattamento al seno o al latte artificiale), terapia antibiotica, infezioni, stress e genetica dell'ospite [115–117].

In generale, si è visto che il latte materno umano promuove la crescita di batteri benefici, come i bifidobatteri [118], tra cui *Bifidobacterium longum*, che sono specializzati nella digestione degli oligosaccaridi contenuti nel latte umano [119]. È stato trovato in uno studio che i bambini con autismo sperimentano un periodo di allattamento al seno significativamente più breve [120]. Inoltre, è stato osservato un rischio più elevato di sviluppare DSA nei bambini che non sono stati allattati al seno [82]. Allo stesso modo, i bambini nati per via vaginale hanno un microbiota con un dominio di *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Snethia spp.* [121], mentre quelli consegnati con parto cesareo hanno una composizione microbiota alterata con un dominio di *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium spp.*, *Escherichia coli* e *Clostridium difficile* [122].

In uno studio svedese basato su un registro di popolazione con circa 2,6 milioni di bambini, è stato osservato che il parto cesareo elettivo rispetto al parto vaginale è associato a un rischio significativamente più alto del 20% di sviluppare DSA nel bambino [123]. D'altra parte, nessuna associazione è stata riportata nell'analisi del controllo dei fratelli. Pertanto, gli autori hanno concluso che il parto cesareo e il DSA non sono associati l'uno all'altro [123]. Allo stesso modo, uno studio

britannico con più di 18.000 partecipanti non ha trovato alcun legame tra il parto cesareo e il DSA [124].

È un fatto accettato che l'uso di antibiotici nei primi 1000 giorni di vita può avere effetti dannosi sulla normale costituzione del microbiota con effetti a lungo termine [125]. È stato anche riferito che molti bambini con DSA assumono dosi relativamente elevate di antibiotici orali nei primi anni di vita, il che potrebbe essere un fattore che porta alla disbiosi [126]. È stato osservato che anche diversi mesi dopo la cessazione del trattamento antibiotico, il recupero del microbiota allo stato pre-terapia è incompleto in una percentuale sostanziale di individui [127]. Pertanto, l'uso precoce di antibiotici nei neonati può alterare la colonizzazione microbica dell'intestino e comportare una diminuzione della diversità tassonomica [127].

L'ipotesi sul possibile ruolo del microbiota intestinale nella patogenesi dell'autismo è iniziata con l'ipotesi che gli effetti neurotossici di *Clostridium* potrebbero essere collegati all'insorgenza dei DSA [100]. Diversi studi hanno dimostrato una maggiore abbondanza di specie appartenenti ai clostridi nei campioni fecali di bambini autistici [81, 128]. È stato anche ipotizzato che l'infezione subacuta e cronica da *Clostridium tetani* possa essere responsabile del disturbo dello sviluppo neurologico [100]. Questo è stato supportato da indagini con risultati promettenti sulla somministrazione di vancomicina orale, minimamente assorbita dalla mucosa intestinale e quindi specificamente rivolta al lume intestinale e al suo microbiota in DSA [129].

La disbiosi può anche essere influenzata dallo stress emotivo e fisiologico, in quanto può alterare il modello di secrezione di muco [130], indurre una riduzione temporanea dello svuotamento gastrico [131, 132] e causare l'attività immunitaria locale alterando la permeabilità intestinale [133]. Tutti questi effetti possono avere un grave impatto sulla proliferazione dei microrganismi intestinali.

Inoltre, ad oggi, la relazione precisa tra la genetica dell'ospite e la disbiosi microbica nei DSA è sconosciuta. Il background genetico è piuttosto complesso, e più di 1000 mutazioni puntiformi sono associate a questa malattia [134–136]. In uno studio di Liu et al., c'erano prove di come la genetica dell'ospite modella la comunità microbica fecale [137]. Molte mutazioni associate ai DSA si verificano in geni che codificano molecole citoplasmatiche e di adesione cellulare sinaptiche, proteine scaffolding e varie molecole coinvolte nella neurotrasmissione o nella regolazione della sintesi proteica sinaptica [136].

Altri fattori ambientali che possono alterare i profili microbici e contribuire all'eziologia dei DSA includono diversi farmaci, tra cui l'acido valproico, che alterano la funzione microbica intestinale, compresa la produzione di SCFA [138]. È stato anche dimostrato che il rischio di diagnosi di DSA aumenta nei bambini nati da madri che assumevano valproato [139].

Inoltre, la dieta svolge un ruolo chiave nel determinare la composizione e la funzione del microbioma intestinale [115, 140].

I bambini con DSA spesso consumano una dieta più selettiva e si rifiutano di mangiare determinati alimenti, probabilmente a causa dell'iper/iposensibilità all'input sensoriale associata ai DSA [141, 142]. Pertanto, una dieta selettiva potrebbe influenzare la composizione del microbiota intestinale. Sono stati dimostrati cambiamenti significativi nel microbiota intestinale umana dopo aver mangiato una dieta tutta animale o vegetale per soli quattro giorni [143]. In generale, l'assunzione di una dieta ricca di verdure, frutta e fibre è associata a una maggiore ricchezza e diversità tassonomica del microbiota intestinale [144].

Su questo argomento, negli ultimi anni, l'emergere della metabolomica ha permesso di rilevare efficacemente le alterazioni dei metaboliti nel DSA [145]. I principali studi metabolomici sui campioni di sangue sono riassunti in Tabella 2. Sono stati riportati livelli ridotti di antiossidanti, alti livelli di composti fenolici di derivazione batterica e un'alta concentrazione di SCFA nelle urine, nelle feci e nel sangue dei bambini con autismo [146–149]. Questi fattori possono comportare una funzione mitocondriale anormale dei neuroni, che regolano epigeneticamente l'espressione genica correlata ai DSA [59, 150]. Inoltre, i livelli di aminoacidi liberi sono molto più alti nei bambini autistici di quanto non lo siano nei controlli e sono correlati con l'aumento dei batteri proteolitici, come *Clostridium* e *Bacteroidetes* [150]. In uno studio di Noto et al., livelli elevati di acido 3-(3-idrossifenil)-3-idrossipropanoico, acido 3,4-diidrossibutirrico, fenilalanina, tirosina, acido *p*-idrossifenilacetico e acido omovanillico, gli ultimi quattro dei quali sono coinvolti nella via della tirosina che porta al neurotrasmettitore catecolamina, sono stati trovati nelle urine di 21 bambini con DSA rispetto ai loro fratelli [151].

Oltre ai fattori sopra menzionati, l'alterazione dei neurotrasmettitori è un altro potenziale meccanismo che collega la disbiosi allo sviluppo dei DSA. L'iposerotonemia è stata riportata nel cervello e nel sangue di individui con DSA [140]. Secondo alcuni autori, l'interruzione di questo biomarcatore potrebbe riguardare la disbiosi intestinale perché, come accennato in precedenza, il 95% della serotonina circolante è prodotta da cellule enterocromaffini intestinali [91]. Secondo DeTheije et al., lo stato infiammatorio intestinale di basso grado dei bambini con DSA può indurre cellule enterocromaffini, mastociti e piastrine a produrre serotonina, inducendo la dismotilità intestinale e il consumo di triptofano [152]. Inoltre, la disbiosi può ridurre la disponibilità di triptofano diminuendo l'assorbimento degli aminoacidi dalla dieta [153]. Di conseguenza, nonostante i livelli più elevati di serotonina circolante dall'intestino, la disponibilità efficace di questo neurotrasmettitore al SNC può effettivamente essere diminuita. Sfortunatamente, né l'integrazione di triptofano né gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina si sono mai dimostrati efficaci [50].

L'esatta funzione del microbiota intestinale nei DSA è ancora oggetto di dibattito. Sebbene gli studi disponibili riportino risultati spesso contrastanti, un'analisi approfondita delle modificazioni del microbioma, considerando sia i fattori genetici che ambientali, potrebbe fornire informazioni utili per lo sviluppo di strategie preventive mirate alla modulazione del microbiota.

Tabella 2. Metaboliti nei campioni ematici di soggetti con DSA (da Dargenio et al. modificato, 2023, [154]).

Referenze	N di soggetti	Tecnica analitica	Metaboliti aumentati	Metaboliti ridotti	Processi metabolici coinvolti
Kuwabara et al. (2013) [155]	32 DSA 40 controls	CE-TOF-MS	Taurina, arginina	Acido lattico, 5-oxoprolina	<ul style="list-style-type: none"> Stress ossidativo Disfunzione mitocondriale
West et al. (2014) [156]	52 DSA 30 controlli	LC-MS and GC-MS	Aspartato, glutammato, solfato di DHEA, serina, acido glutarico, Acido 5-aminovalerico lattam, 5-idrossinorvalina, acido succinico, acido 3-aminoisobutirrico, Acido 2-idrossivalerico	Omocitrullina, acido lattico, Acido 2-idrossivalerico, cistina, acido miristico, isoleucina, creatinina, acido metilesadecanoico, Acido 4-idrossifenillattico, acido citrico, acido eptadecanoico	<ul style="list-style-type: none"> Stress ossidativo Malattia o disfunzione mitocondriale Produzione di energia Metabolismo dell'omocitrullina
Wang et al. (2016) [157]	173 DSA 163 controlli	UPLC/Q-TOF MS/MS	Fitosfingosina, sfingosina 1-fosfato, pregnanetriol, LysoPC(20:3(5Z,8Z,11Z)), LysoPC(18:3(6Z,9Z,12Z)), 9,10-epoxyoctadecenoico	L-acetilcarnitina, decanoilcarnitina, acido adrenico, acido urico, acido arachidonico, acido docosaesaenoico, acido docosapentaenoico	<ul style="list-style-type: none"> Disfunzione mitocondriale β-ossidazione degli acidi grassi
Anwar et al. (2018) [158]	38 DSA 31 controlli	LC-MS	N ϵ -carbossimetil-lisina, treonina, idroimidazolone et \grave{a} derivata da metilgliosale, arginina, glutammina, glutamicacido, n ω -carbossimetilarginina, semialdeide glutammica, semialdeide α -aminoadipica	3-deossiglucosone, triptofano, n ϵ -fruttosil-lisina, n-formilkynurenina, derivata dall'et \grave{a} di idroimidazolone da glioxal	<ul style="list-style-type: none"> Stress ossidativo Glicazione proteica
Barone et al., (2018) [159]	83 DSA 79 controlli	ESI-Tandem MS/MS	Hexadecenoylcarnitine, octadecenoylcarnitine, acetylcarnitine, methylmalonyl/3-OH- isovalerylcarnitine, citrulline, decanoylcarnitine, tetradecadienoylcarnitine, dodecanoylcarnitine, hexadecanoylcarnitine		<ul style="list-style-type: none"> Biosintesi degli aminoacidi Metabolismo degli acidi grassi Disfunzione mitocondriale Disturbi gastrointestinali
Delaye et al. (2018) [160]	22 DSA 29 controlli	Amino acid chromatographs		Glutammato, glicina, serina	<ul style="list-style-type: none"> Metabolismo dei neurotrasmettitori
Grayaa et al. (2018) [161]	36 DSA 38 controlli	GC-MS	24-idrossicolesterolo	25-idrossicolesterolo, 7 α -idrossicolesterolo	<ul style="list-style-type: none"> Citotossicit\grave{a} Metabolismo del colesterolo Apoptosi Disfunzione sinaptica

					<ul style="list-style-type: none"> • Stress ossidativo
Karhson et al. (2018) [162]	59 DSA 53 controlli	LC-MS/MS		Anandamide	<ul style="list-style-type: none"> • Segnalazione endocannabinoide retrograda
Lv et al. (2018) [163]	60 DSA 30 controlli	MS/MS		Carnitina di carnosil, carnitina libera, ventiquattro carnitina carbonilica, carnitina ottilica, carnitina glutarilica	<ul style="list-style-type: none"> • Disfunzione mitocondriale • Metabolismo degli acidi grassi
Aran et al. (2019) [164]	93 DSA 93 controlli	LC-MS/MS		<i>N</i> -arachidonoiletanoloammina, <i>n</i> -oleoylethanolamine, <i>n</i> -palmitoiletanoloammina	<ul style="list-style-type: none"> • Segnalazione endocannabinoide retrograda
Kelly et al. (2019) [165]	403 bambini inclusi 52 DSA	UPLC-MS/MS	Trimetilammina N-ossido, cinnamoilglicina, oleoil etanolamide, linoleoil etanolamide, docosaesaenoilcarnitina, prolidrossiprolina, alfa-chetobutirrato, palmitoil etanolamide, eritritolo, serotonina	<i>N</i> -formilfenilalanina, 5-idrossiindoleacetato, pirralina, acido <i>n</i> -formilantranilico, sfingomielina (d18:1/25:0, d19:0/24:1, d20:1/23:0, d19:1/24:0)	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo dell'endocannabinoide • Xenobiotica e metabolismo del triptofano • Metabolismo degli aminoacidi • Metabolismo dei fosfolipidi • Metabolismo degli acidi grassi • Ciclo di urea • Metabolismo dei sfingolipidi
Orozco et al. (2019) [166]	167 DSA 193 controlli	H-NMR	Glicina, serina, ornitina, cis-aconitate		<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo del carbonio • Ciclo TCA • Ciclo di urea
Rangel-Huerta et al. (2019) [167]	20 DSA 30 controlli	UPLC-MS/MS	1 1-metilnicotinamide, 3-Indossil solfato, 4-metil-2-oxopetano, 5-bromotriptofano, sebacato, dodecanedioato, aspartato, orotato, galattitolo, N-acetil-aspartyl, 6-idrossiindolo solfato, cortisone, metionina, triptofano, arginina -glutamilmietionina, ursodeossicolato, sfingomieline, cinurenina, colina fosfato, decanoilcarnitina, 2-keto-3-deossiglutamato, arachidato, behenato, fruttosio	Glutamato, 1-stearoil-glicerolo-fosfatidiletolamina, 1-palmitoil-glicerolo-fosfatidiletolamina, nicotinammide	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo degli aminoacidi, dei lipidi e della nicotinammide
Smith et al. (2019) [168]	516 DSA 164 controlli	Triple Quadrupole LC-MS	Glutammina, ornitina, glicina, rapporto ornitina a isoleucina, rapporto ornitina a valina, rapporto glutammina e leucina, rapporto glicina/leucina, rapporto glutammina e isoleucina, rapporto ornitina/leucina, rapporto glutamina/valina/valina rapporto glicina-isolaucina, rapporto glicina/valina	Isoleucina, leucina, valina	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo degli aminoacidi • Compromissioni neurologiche
Shen et al. (2022) [169]	5 DSA 5 controlli	UPLC/Q-TOF MS/MS	L-Glutamina	L-Glutammato, alanina, aspartato, O-fosfo-4-idrossi-Ltreonina, piridossamina, 4-piridossato	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo della niacina e della niacinamide

					<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo della vitamina B6 • Biosintesi dell'arginina • Metabolismo dei sfingolipidi
Wang et al. (2022) [170]	29 DSA 30 controlli	LC-MS/MS	Valina, acido palmitoleico, epsilon-caprolactam, acido arachidonico, prostaglandina D2	Colina, 5-aminoimidazolo ribonucleotide, 1-acilglicerofosocolina, deossiribosio, acido benzoico, 3-butinoato, ornitina	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolismo dell'acido arachidonico • Sinapsi serotoninergica • Metabolismo della colina

ASD, Disturbo dello spettro autistico; CE-TOF-MS, elettroforesi capillare-spettrometria di massa del tempo di volo; LC-MS, cromatografia liquida-spettrometria di massa; GC-MS, gascromatografia-spettrometria di massa; MS/MS spettrometria di massa in tandem; UPLC/Q-TOF-MS cromatografia liquida ad alte prestazioni-spettrometria di massa del tempo di volo a quattro poli; H-NMR, risonanza magnetica nucleare idrogeno-1; TCA, ciclo dell'acido tricarbossilico; DHEA, deidroepiandrosterone.

1.4.1. Composizione microbica nei DSA

Rispetto ai bambini neurotipici i pazienti con DSA presentano un'alterazione significativa nella composizione del microbiota intestinale [171]. Il microbiota dei bambini con DSA è caratterizzato da un aumento relativo di alcuni batteri appartenenti al phylum Bacteroidetes [*Barnesiella*, *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Odoribacter*, *Prevotella*, *Proteobacteria* (ad esempio, *Proteus* e *Parasutterella*) e *Alistipes*] rispetto alla popolazione generale, mentre Actinobacteria (specie *Bifidobacterium*) sono spesso meno abbondanti nei pazienti con DSA [172, 173]. Tuttavia, nessun particolare ceppo microbico che potrebbe essere associato a cambiamenti in vari aspetti come l'età, la dieta, il sesso, la popolazione e la gravità dei DSA è stato identificato per essere alterato in tutti gli studi sul microbiota dei DSA [174, 175]. I pazienti con DSA hanno spesso squilibri microbici di vari tipi, anche se le alterazioni nel microbiota intestinale nei pazienti con DSA non sono sempre le stesse negli studi. La composizione delle specie batteriche differisce ampiamente tra gli individui [176], anche se il microbiota del tratto GI è abbastanza conservato a livello di phylum, dove prevalgono Firmicutes e Bacteroidetes [176, 177].

Molti studi utilizzano campioni fecali come metodo non invasivo per il microbiota intestinale a causa delle difficoltà di campionamento del tessuto intestinale (ad esempio, tramite colonscopia). Sebbene il microbiota fecale sembri rappresentare bene il microbiota colico, esso risulta meno rappresentativo per le altre aree del tratto GI [174, 175]. Il campionamento fecale rappresenta ancora il metodo di riferimento per la maggior parte degli studi sul microbioma intestinale negli esseri umani, poiché il materiale fecale contiene un sottogruppo di microrganismi provenienti sia dal lume intestinale che dalla mucosa. L'introduzione delle tecnologie di Next-Generation Sequencing (NGS) ha reso possibile un'analisi altamente efficiente e indipendente dalla coltura del microbiota intestinale. In

particolare, queste metodologie si basano sull'amplificazione mediante PCR del gene dell'RNA ribosomiale 16S, consentendo una classificazione tassonomica dettagliata delle comunità microbiche.

1.4.1.1. Modelli animali

Studi su modelli animali sono stati condotti per comprendere il possibile collegamento tra cervello, microbiota e intestino nell'autismo.

Studi condotti su modelli murini germ-free, ossia animali nati tramite parto cesareo e allevati in condizioni sterili, hanno dimostrato che la colonizzazione batterica intestinale svolge un ruolo cruciale nello sviluppo e nella maturazione sia del SNE che del SNC [178]. L'assenza di colonizzazione batterica è stata associata a un'alterata espressione e a un turnover compromesso dei neurotrasmettitori sia nel SNC che nel SNE [178, 179]. Inoltre, è stata correlata a disfunzioni sensoriali e motorie intestinali, tra cui ritardo nello svuotamento gastrico, rallentamento del transito intestinale, alterazioni dell'attività mioelettrica intestinale e un aumento delle dimensioni dell'intestino cieco [180].

Uno degli studi più autorevoli in questo ambito, condotto da Hsiao et al., ha esaminato se la modellazione delle caratteristiche comportamentali tipiche dei DSA nei topi potesse determinare anche disfunzioni GI [112]. Per rispondere a questa domanda, i ricercatori hanno utilizzato il modello dell'attivazione immunitaria materna (MIA), una metodologia che prevede l'induzione di una risposta infiammatoria simulando un'infezione virale nelle cavie gravide, al fine di valutare gli effetti dell'infiammazione sulla prole.

Alla nascita, i topi esposti a MIA hanno mostrato alterazioni comportamentali riconducibili a quelle osservate nei soggetti con DSA, tra cui ansia, comportamenti ripetitivi e stereotipati, nonché un deficit nelle interazioni sociali. L'evidenza di tali disfunzioni comportamentali a seguito dell'attivazione immunitaria materna ha rafforzato la validità di questo modello animale per lo studio dei DSA.

Oltre a queste evidenze comportamentali, i ricercatori hanno identificato modifiche nell'intestino e nel microbiota associato delle cavie neonate: il microbiota commensale mostrava una composizione squilibrata simile a quella riscontrata negli esseri umani con DSA, la barriera intestinale risultava più permeabile, e il sistema immunitario era iperattivo. La compromissione della permeabilità intestinale è stata rilevata anche dopo tre anni, indicando che le anomalie intestinali si manifestano e stabilizzano nei primi anni di vita. Inoltre, è stato individuato un particolare metabolita microbico strettamente correlato a uno presente nelle urine dei bambini con DSA. Questa scoperta ha spinto gli studiosi a esaminare gli effetti del trasferimento del metabolita in topi sani nati da madri con sistema immunitario non attivato, e le cavie hanno manifestato le stesse anomalie comportamentali riscontrate nella prole di madri attivate. Di particolare rilevanza, è emerso che la somministrazione di batteri

intestinali umani noti come *Bacteroides fragilis* nei topi con attivazione immunitaria materna ha corretto la permeabilità intestinale, l'attivazione immunitaria e parzialmente anche i comportamenti anomali.

I risultati dello studio, soprattutto quelli legati al miglioramento comportamentale, generarono grande interesse ed entusiasmo non solo nella comunità scientifica, ma anche tra le aziende che erano pronte a presentare nuove opzioni terapeutiche per i disturbi come i DSA.

Diversi studi hanno mostrato che i topi "germ-free", ovvero privi di microbiota, manifestano minori segni di ansia quando sono esposti a nuovi ambienti potenzialmente avversi, mostrando una maggiore propensione all'esplorazione e una minore preoccupazione riguardo alla possibile presenza di un predatore. Inoltre, si osserva una compromissione delle competenze sociali, soprattutto nei maschi, e un aumento dei comportamenti ripetitivi [179, 181, 182].

A livello cognitivo, si riscontra una compromissione delle funzioni esecutive in compiti di memoria non-spaziale e di lavoro, come il riconoscimento di oggetti nuovi e l'alternanza spontanea valutata nel test del "labirinto a T". In uno studio recente è stato esaminato il ruolo del microbiota nel comportamento sociale utilizzando il test "delle tre camere" [182]. I topi "germ-free" mostravano una compromissione nella socializzazione, specialmente nei maschi, evidenziata dalla mancanza di preferenza per la camera contenente un altro topo rispetto a una vuota. Questo comportamento era associato a una ridotta propensione ad esplorare situazioni sociali nuove, indicando un minor interesse nel trascorrere tempo con un topo "nuovo" rispetto a uno conosciuto, un comportamento considerato anomalo per un animale naturalmente socievole. Queste caratteristiche richiamano il deficit sociale osservato in alcuni pazienti affetti da autismo.

Si è notato che la colonizzazione batterica dopo il divezzamento riduceva l'evitamento di situazioni sociali nei topi "germ-free", e questo effetto diventava più evidente quanto prima avveniva la colonizzazione. È stato scientificamente provato che gli effetti del microbiota intestinale sul comportamento sono dipendenti dall'età, suggerendo l'esistenza di una finestra temporale, particolarmente presente nelle prime fasi della vita, durante la quale le modifiche al microbiota possono influenzare in modo significativo sia il SNE sia il SNC [183]. Un gruppo di ricercatori canadesi ha esaminato gli effetti dell'esposizione a metaboliti batterici come il lipopolisaccaride e l'acido propionico in diverse fasi dello sviluppo (prenatale e postnatale) in topi [71, 72]. Questa esposizione ha determinato conseguenze di diversa entità sul comportamento, con differenze specifiche tra i topi maschi e femmine, inclusi comportamenti ripetitivi, ritiro sociale e atipie sensoriali.

In uno studio del 2019 di Sharon et al., è stato dimostrato che modelli murini senza germi mostravano un comportamento simile ai DSA dopo la colonizzazione con il microbiota fecale di donatori umani

con autismo [76]. In questo studio, i soggetti con DSA avevano un'abbondanza diversa di Clostridiaceae, Lactobacillales, Enterobacteriaceae e Bacteroidetes rispetto al gruppo controllo. Hanno anche osservato che i topi trattati con il microbiota intestinale dei pazienti con DSA presentavano uno splicing alternativo di molti geni correlati ai DSA nel SNC. Inoltre, è stata osservata una riduzione di alcuni profili di metaboliti nel gruppo DSA, in particolare l'acido 5-aminovalerico e la taurina [76].

L'uso di sottoprodotti del metabolismo batterico enterico ha evidenziato che lo sviluppo e il comportamento nei modelli murini subiscono alterazioni simili a quelle osservate nei soggetti con autismo. Ripetute infezioni o disfunzioni del sistema immunitario durante la gestazione e nei primi anni di vita potrebbero influenzare la composizione del microbiota intestinale, determinando la produzione di metaboliti in grado di alterare lo sviluppo neurologico in individui predisposti.

La somministrazione di acido propionico in diverse fasi dello sviluppo ha indotto fenotipi comportamentali differenti, suggerendo che un insulto ambientale possa contribuire alla manifestazione di un ampio spettro di sintomi con vari livelli di gravità, analogamente a quanto osservato nei DSA. Studi condotti su modelli murini hanno dimostrato che l'iniezione diretta di propionato, un metabolita prodotto dalla fermentazione batterica dei clostridi, in specifiche aree cerebrali può determinare alterazioni comportamentali significative. Questo dato è particolarmente rilevante poiché nei soggetti con autismo è stata riscontrata un'abbondanza di clostridi nelle feci.

Inoltre, lo studio condotto da De Theije et al. ha rilevato che l'esposizione al valproato nei topi determina cambiamenti comportamentali simili a quelli osservati nei DSA, accompagnati da modificazioni nella composizione del microbiota intestinale [65]. Studi post-mortem suggeriscono ridotti livelli di serotonina nella corteccia prefrontale, nell'amigdala e nell'intestino tenue nei maschi esposti al valproato durante la vita intrauterina. L'esposizione umana al valproato durante la gravidanza è stata correlata allo sviluppo successivo di autismo [184].

Attualmente, si sta attribuendo sempre più attenzione all'ossitocina, il peptide ipotalamico che ha dimostrato di poter aumentare la socialità. Nei topi privati geneticamente del recettore dell'ossitocina tramite knockout, si manifestano significative carenze nel comportamento sociale. Studi preliminari condotti su scala ridotta negli esseri umani indicano che l'ossitocina, somministrata per via intranasale, potrebbe avere un impatto positivo sul comportamento sociale nei modelli di comportamento. Attualmente, sono in corso diversi studi clinici per testare l'ossitocina come parte di una terapia per i disturbi dello spettro autistico. Tuttavia, c'è ancora dibattito sull'effettiva utilità dell'ossitocina nell'uomo [59].

Negli studi su modelli animali, si sono riscontrati cambiamenti nel microbiota intestinale non solo in risposta a sostanze esogene, ma anche come risultato di fattori di stress emotivo-ambientale. La

separazione precoce dalla madre nei roditori, noto modello di stress, è stato associato a marcate alterazioni delle popolazioni batteriche nel microbiota fecale, che possono persistere anche nell'età adulta [185].

Numerosi sono i fattori di rischio perinatali che possono influenzare la fisiologia materno-fetale, tra cui lo stress, le infezioni, l'allattamento artificiale, l'età materna, l'uso di antibiotici, l'obesità e il diabete gestazionale. È importante evidenziare i cambiamenti del microbiota come potenziali e rilevanti fattori di rischio [64].

Uno studio quasi recente condotto da Buffington et al. ha esaminato gli effetti dell'obesità materna indotta da una dieta ricca di grassi [186]. Si è riscontrato che questa condizione altera il microbioma intestinale della prole e induce deficit socio-comportamentali associati a segnali alterati del sistema mesolimbico della ricompensa. In modo sorprendente, il trapianto del microbiota da topi di controllo a topi sperimentali ha completamente corretto la compromissione sociale, evidenziando il ruolo chiave del microbiota nella regolazione del comportamento sociale dei topi. Inoltre, l'uso del probiotico *Limosilactobacillus (L.) reuteri* è in grado di migliorare questo aspetto. I risultati relativi al microbiota intestinale sono stati associati alla sua capacità di modulare la produzione di ossitocina nei neuroni ipotalamici e all'attivazione dell'area tegmentale ventrale. Numerosi studi hanno evidenziato che l'ossitocina può contribuire a ridurre i comportamenti ripetitivi nei soggetti con DSA e a migliorare la capacità di riconoscere le emozioni nei bambini con la stessa diagnosi.

1.4.1.2. Il microbiota fecale nei DSA

Un fenomeno frequentemente osservato nelle feci dei bambini con DSA è la riduzione del rapporto tra Bacteroidetes e Firmicutes. Questa alterazione potrebbe derivare da una diminuzione dell'abbondanza relativa del phylum Bacteroidetes, noto per il suo ruolo nella digestione dei polisaccaridi [121, 187–190]. Settanni et al. hanno avanzato l'ipotesi che le persone con DSA possano presentare una digestione compromessa dei carboidrati, associata a una condizione di disbiosi a livello della mucosa intestinale [191, 192]. Dati contrastanti sono emersi dallo studio condotto da De Angelis et al. su un campione di 30 bambini, in cui i soggetti con DSA presentavano un rapporto più elevato di Bacteroidetes rispetto ai Firmicutes, in contrasto con quanto osservato nei gruppi di controllo [193]. Tuttavia, questi risultati non erano statisticamente rilevanti [193]. Nello stesso studio, i phyla Verrucomicrobia e Fusobacteria erano rappresentati in concentrazioni più basse nelle feci di 10 DSA rispetto a 10 controlli [193].

In uno studio di Kang et al., il microbiota fecale di 20 bambini autistici con problemi GI è stato confrontato con quello di 20 bambini neurotipici e ha mostrato una diversità batterica

significativamente più bassa nei bambini con DSA [126, 194]. Inoltre, hanno riportato una diminuzione dell'abbondanza di Coprococcus, Prevotellaceae e Veillonellaceae nei pazienti con DSA [195]. *Prevotella spp.* sono microbi intestinali commensali specializzati nella sintesi della vitamina B1 e nella degradazione dei polisaccaridi vegetali. Pertanto, una carenza di vitamina B1 potrebbe essere determinata da una minore abbondanza di *Prevotella spp.* Sono state osservate differenze minori nel genere *Sutterella*, che è meno rappresentato nei bambini con DSA [126]. Questi risultati suggeriscono una composizione modificata del microbiota nei bambini con DSA che potenzialmente potrebbe avere implicazioni biochimiche e funzionali per l'ospite.

In ricerche precedenti, alcune *Prevotella spp.* (*Prevotella oralis*, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella tanneri*) sono risultate ridotte nei pazienti con sindrome dell'intestino irritabile [36]. Questa ricerca suggerisce che i sintomi GI nei DSA sono correlati all'alterato equilibrio del microbiota [195].

In altre ricerche passate, la quantità del genere *Akkermansia* è stata segnalata per diminuire nei bambini con DSA, mentre la quantità di *Desulfovibrio spp.* è aumentata [188, 196]. Questi ultimi batteri sono riconosciuti come dannosi, in quanto potrebbero esacerbare i modelli di DSA e i disturbi GI [197].

In una recente revisione sistematica e metanalisi condotta da Iglesias-Vázquez et al., che ha analizzato 18 studi su un totale di 493 bambini con DSA e 404 controlli sani, è emerso che il microbiota intestinale è composto prevalentemente dai generi Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes. Inoltre, è stato osservato che questi generi batterici risultavano più abbondanti nei bambini con DSA rispetto ai controlli. [198].

I bambini con DSA hanno mostrato un aumento relativo dei generi *Bacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Clostridium*, *Parabacteroides* e *Faecalibacterium* e una minore quantità di *Coprococcus* e *Bifidobacterium*. Gli autori hanno concluso suggerendo l'effettiva esistenza della disbiosi nei bambini autistici che potrebbe influenzare lo sviluppo e la gravità della sintomatologia autistica [198]. Tuttavia, sono stati riportati risultati controversi tra gli studi inclusi nell'analisi. Per i Bacteroidetes, la maggior parte degli studi ha identificato una maggiore abbondanza nei bambini con DSA [126, 192, 199–202], mentre altri hanno riportato risultati opposti [190, 203, 204]; per Firmicutes, alcuni studi hanno mostrato percentuali maggiori nei bambini con DSA [190, 203, 204], mentre altri hanno mostrato percentuali maggiori nei controlli sani [199, 201, 202], e altri ancora addirittura non suggeriscono differenze tra i gruppi [126, 200]. Per gli Actinobacteria, l'abbondanza relativa non era significativamente diversa tra quelli con DSA e i controlli.

1.4.1.3. *Il microbiota intestinale nei DSA (campioni bioptici)*

Alcuni altri studi hanno invece esaminato il microbiota mucosale da campioni bioptici intestinali. In uno studio condotto da William et al., l'analisi del microbiota è stata effettuata su biopsie intestinali prelevate dal cieco e dall'ileo terminale. I risultati hanno evidenziato una maggiore abbondanza di *Sutterella* spp. nei bambini con DSA rispetto ai controlli, con una presenza significativamente superiore in 23 bambini con DSA rispetto ai 9 controlli. Generalmente, *Sutterella* spp. risultano poco rappresentate nel microbiota intestinale di soggetti sani e, infatti, non sono state rilevate in alcuno dei controlli sani. Tuttavia, la loro presenza è stata riscontrata in 12 dei 23 bambini con DSA [205]. Kushak et al. hanno anche studiato la composizione microbica in biopsie duodenali confrontando 19 bambini con DSA con 21 controlli senza trovare differenze significative tra il phyla, ma gli autori hanno osservato alcune alterazioni ai livelli di genere e specie [206]. In particolare, il genere *Burkholderia* è stato ritrovato significativamente aumentato nei soggetti con DSA rispetto ai controlli. I generi *Oscillospira*, *Actinomyces*, *Ralstonia* e *Peptostreptococcus* erano aumentati e i generi *Bacteroides*, *Devosia*, *Neisseria*, *Prevotella* e *Streptococcus* erano sottorappresentati nei bambini con DSA rispetto ai controlli. Inoltre, sono state riportate minori abbondanze di *Escherichia coli* [206]. Kushak et al. non sono stati in grado di identificare differenze significative a livello di phylum, come altre ricerche hanno citato [188–190, 193], probabilmente perché tutti gli altri studi hanno analizzato la composizione del microbiota intestinale di campioni fecali e non biopsie della mucosa duodenale. Come accennato in precedenza, i campioni di feci rappresentano ampiamente la composizione del microbiota dell'intestino crasso [207]. Kushak et al. hanno invece mappato la composizione microbica dell'intestino tenue e, nelle loro conclusioni, gli autori hanno suggerito che le alterazioni microbiche nell'intestino crasso possono avere un effetto più importante sui DSA rispetto alle alterazioni nell'intestino tenue. Quindi, una rappresentazione più chiara dell'ambiente del microbiota intestinale può essere ottenuta raccogliendo campioni di mucosa da tutto il tratto intestinale per comprendere meglio le interrelazioni del funzionamento e dell'interazione del microbiota con l'ospite.

Una ridotta abbondanza di *Bacteroides*, con rapporto Firmicutes/Bacteroidetes significativamente aumentato, è stata trovata nelle biopsie di ileo e cieco di 15 bambini autistici (7 controlli) [189]. Le quantità di Firmicutes erano leggermente aumentate nel gruppo con DSA. La classe Betaproteobatteri (Proteobacteria) era significativamente più abbondante nei campioni fecali del cieco dei pazienti con DSA [189].

Inoltre, nella popolazione autistica oltre alle modificazioni della flora batterica, si è osservata disbiosi fungina. Il lievito *Candida albicans*, che rende l'ammoniaca e altre tossine probabilmente associate al comportamento correlato ai DSA, è stato identificato nelle viscere dei bambini autistici più spesso

che in quelli dei bambini non-DSA [208, 209]. Uno studio di Kantarcioglu et al. ha trovato una quantità maggiore di *Candida spp.* nell'intestino di 415 individui autistici rispetto a quella di 403 controlli [209]. Gli autori hanno stimato che circa il 60% della popolazione sana sono portatori asintomatici di *Candida spp.*, che sembra essere associato ad alcuni comportamenti autistici [209]. Nei soggetti con DSA, l'alterazione della diversità del microbiota favorisce l'aumento di *Candida spp.*, che, una volta insediata nell'intestino, ostacola la ricolonizzazione del microbiota commensale [190]. *Candida spp.* produce ammoniaca e tossine e provoca anche il malassorbimento di minerali e carboidrati, che potrebbe svolgere un ruolo nella fisiopatologia dei DSA [209].

1.4.1.4. *Microbiota intestinale sui soggetti con DSA e i loro fratelli*

Gli studi di controllo sui fratelli presenti in letteratura hanno fornito risultati contrastanti. In uno studio slovacco condotto da Tomova et al. su un campione di 29 partecipanti, comprendente bambini con DSA, i loro fratelli e controlli sani, è stato riportato che le quantità di *Lactobacillus spp.*, *Desulfovibrio spp.* e *Clostridia spp.* erano significativamente aumentate nelle feci dei soggetti con DSA rispetto a quelle dei loro fratelli e dei controlli. Inoltre, *Bifidobacterium spp.* era diminuita nei bambini autistici [188]. *Desulfovibrio spp.* potrebbe essere un fattore essenziale nell'infiammazione GI perché il suo principale sottoprodotto metabolico, l'idrogeno solforato, è citotossico per le cellule epiteliali del colon [210]. Inoltre, quando somministrata ai roditori, *Desulfovibrio spp.* riduce la memoria di lavoro [211].

L'abbondanza di *Desulfovibrio spp.* è stata associata dai ricercatori alla gravità dei sintomi comportamentali nella comunicazione, nell'interazione sociale e nel comportamento ristretto/ripetitivo nei DSA. Nei fratelli sani di bambini con DSA, è stata mostrata una minore abbondanza di Bacteroidetes e *Bifidobacterium spp.* e una maggiore quantità di *Desulfovibrio spp.* rispetto a quelle dei bambini autistici. Pertanto, gli autori hanno ipotizzato che i livelli di ceppi batterici possano essere il fattore chiave di svolta tra i fenotipi sani e DSA [188].

Al contrario, non sono state trovate differenze significative in uno studio condotto da Gondalia et al. sulla composizione microbica di 51 soggetti con DSA e dei loro 53 fratelli sani [203]. Allo stesso modo, anche un altro studio che ha incluso 59 bambini con DSA e 44 fratelli sani non ha riportato differenze significative nella composizione del microbiota intestinale [212]. Questi risultati implicano che il microbiota dei fratelli è simile e indipendente dal loro fenotipo autistico [203], probabilmente a causa dell'ambiente condiviso e dell'eredità genetica [62].

Rispetto ai soggetti sani neurotipici, è stato dimostrato che i bambini autistici hanno una quantità significativamente più alta di *Clostridium spp.*, che è stata associata alla gravità della malattia

secondo il punteggio di valutazione dell'autismo infantile (punteggio CAR) [171, 208, 213]. In uno studio condotto da Finnegold et al. su campioni fecali di 33 bambini con DSA, hanno osservato un tasso significativamente più alto di *Clostridium perfringens* che produce il gene beta2-tossina nei bambini con DSA rispetto a quello di 13 controlli [194]. Allo stesso modo, Alshammari et al. hanno osservato una maggiore presenza di *Clostridium perfringens* nei bambini con DSA rispetto a quella nei controlli [214, 215]. Inoltre, la tossina Beta2 è stata collegata a più anomalie GI, come intossicazione alimentare e diarrea [187]. Fisher et al. hanno scoperto che i campioni di feci di pazienti con DSA avevano il 79% di tossina beta2, mentre era solo il 38% nei controlli [187].

Gli autori hanno suggerito che un'infezione tetanica subacuta da *Clostridium tetani*, un agente patogeno opportunistico, potrebbe causare alcuni casi di DSA a seguito della produzione di neurotossina tetanica [100]. Inibisce la scarica delle vescicole sinaptiche che trattengono neurotrasmettitori scindendo irreversibilmente la sinaptobrevina. Le sinapsi con sinaptobrevina scissa si degradano e la diminuzione dell'attività sinaptica è correlata alla diminuzione del comportamento sociale trovato nei DSA [100].

Tutti gli studi citati hanno riportato un profilo batterico disbiotico nei bambini con DSA. Tuttavia, la direzione della causalità, cioè se le alterazioni nei profili microbici siano correlate all'insorgenza dei DSA, è ancora un tema in fase di studio.

1.5. Probiotici nei DSA

Poiché attualmente, non sono disponibili terapie efficaci per i DSA, in genere, i genitori di bambini con DSA ricorrono a interventi personalizzati, in base alle specifiche esigenze derivanti dai sintomi manifestati. L'aumento della prevalenza di questi disturbi rende ancora più urgente la ricerca di trattamenti efficaci e sicuri. Negli ultimi anni, sono emerse numerose evidenze che suggeriscono come la modulazione del microbiota intestinale potrebbe rappresentare una potenziale opzione terapeutica per i bambini con DSA.

1.5.1. Evidenze cliniche

In tabella 3 sono elencati gli studi che valutano effetti delle formulazioni probiotiche e simbiotiche in individui con DSA (Tabella 3). L'integrazione con probiotici offre un approccio semplice e non invasivo per modulare la composizione e le funzioni del microbiota intestinale, influenzando probabilmente anche la segnalazione immunitaria dell'ospite. Ciò potrebbe comportare un miglioramento o una prevenzione dell'infiammazione [195, 216].

In un recente studio condotto in un modello animale di disturbo ossessivo-compulsivo, la somministrazione di *Lactobacillus casei* ha ridotto i sintomi del disturbo ossessivo-compulsivo, che sono probabilmente secondari alla regolazione dell'espressione genica correlata alla serotonina [217].

In un altro studio su modello murino, il trattamento con *Bacteroides fragilis* ha effettivamente ridotto la permeabilità intestinale e i livelli alterati di citochine, dimostrando di essere un potenziale trattamento per migliorare la permeabilità intestinale e i sintomi comportamentali [112].

In uno studio randomizzato controllato con placebo condotto da Parracho et al., l'integrazione con *Lactobacillus plantarum* WCSF1 per tre mesi nei bambini con DSA ha comportato un miglioramento dei sintomi intestinali ($p < 0,01$) ma anche, outcome più importante, un miglioramento dei punteggi comportamentali ($p < 0,05$) [218]. Gli autori hanno osservato un aumento negli enterococchi e nei lattobacilli e una diminuzione del cluster XIVa di *Clostridium* rispetto a quelli del gruppo placebo [218].

Kałużna-Czaplińska e Blaszczyk hanno eseguito uno studio open-label integrando 22 bambini con DSA di età compresa tra 4 e 11 anni con *Lactobacillus acidophilus* Rosell-11 per due mesi [219]. Gli autori hanno scoperto che l'integrazione probiotica aiuta a mitigare i problemi comportamentali che sono caratteristici nei DSA e a ridurre significativamente i livelli urinari di D-arabinitolo, un metabolita di *Candida spp.*, rispetto alla base ($p < 0,05$) [219].

West et al. hanno esaminato l'efficacia di Delpro[®], un integratore probiotico con una miscela di cinque ceppi di bifidobatteri e lattobacilli con l'aggiunta del Del-Immune V[®] (*Lacticaseibacillus rhamnosus* V, lisato cellulare) nei bambini con DSA ($n = 33$, 3-16 anni) [220]. Dopo tre settimane di trattamento, i partecipanti hanno riportato una riduzione del 48% della gravità della diarrea e una riduzione del 52% della gravità della stitichezza. Inoltre, l'88% dei bambini ha mostrato un miglioramento dei sintomi nei DSA con una riduzione dei punteggi di gravità [220].

Un altro studio pilota di Tomova et al. ha trattato i bambini con DSA ($n = 10$, 5-17 anni), i loro fratelli ($n = 9$) e i controlli neurotipici ($n = 10$) con una miscela di probiotici (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus spp.*) per quattro mesi [188]. I ricercatori hanno descritto una significativa riduzione di *Bifidobacterium* e *Desulfovibrio spp.* e nella normalizzazione del rapporto Bacteroidetes/Firmicutes nelle feci dei bambini con DSA, ma anche una riduzione dei livelli di TNF- α , una citochina infiammatoria chiave nell'infiammazione intestinale ($p < 0,05$) [188]. Trattando i bambini con DSA ($n = 30$, 5-9 anni) per tre mesi con una miscela di probiotici (*Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum*), Shaaban et al. hanno riscontrato un aumento significativo dei bifidobatteri e dei lattobacilli nei campioni di feci insieme a una riduzione dei punteggi di gravità dell'autismo rispetto ai risultati basali ($p = 0,0001$) e alla gravità totale dei sintomi GI ($p < 0,0001$) [221].

Un cross-over più recente, uno studio pilota randomizzato controllato con placebo di Arnold et al., ha valutato l'entità dell'effetto e della sicurezza di VISBIOME (precedentemente VSL#3), una miscela di otto ceppi probiotici di lattobacilli, bifidobatteri e *Streptococcus termofili* in bambini con DSA e comorbidità di ansia e disturbi GI ($n = 13$, 3-12 anni) [222]. L'integrazione probiotica ha prodotto miglioramenti non significativi e temporanei nei sintomi GI rispetto al placebo ($p = 0,02$) e non ha modificato la diversità delle specie batteriche e la composizione del microbioma [222].

Inoltre, in un altro recente studio clinico randomizzato in doppio cieco controllato con placebo condotto da Santocchi et al., VISBIOME è stato somministrato a bambini in età prescolare con DSA ($n = 63$, 18-72 mesi) per sei mesi [223]. Il trattamento probiotico non ha portato a differenze significative nella gravità dell'autismo o nei marcatori infiammatori fecali o del sangue tra i gruppi [223]. Nell'analisi del sottogruppo di pazienti senza sintomi GI, l'integrazione probiotica ha ridotto significativamente i punteggi totali di gravità dell'autismo rispetto al placebo ($p = 0,026$). Allo stesso modo, nel sottogruppo di pazienti con manifestazioni GI, c'è stata una significativa diminuzione dei punteggi di gravità dei sintomi GI rispetto al placebo ($p = 0,0191$) [223].

In uno studio randomizzato controllato del 2020, Wang et al. hanno somministrato una miscela probiotica (un pacchetto al giorno contenente *Lacticaseibacillus rhamnosus* HN001, *Bifidobacterium lactis* BL-04, *Bifidobacterium infantis* Bi-26 e *Lactobacillus paracasei* LPC-37) in combinazione con un prebiotico costituito da frutto-oligosaccaridi o un placebo nei bambini con DSA ($n = 26$, 2-8 anni) per 30-108 giorni [224]. L'integrazione ha mostrato un miglioramento significativo delle manifestazioni GI (diarrea, costipazione e odore fecale) nel braccio di trattamento ($p < 0,001$), una significativa riduzione dei punteggi di gravità dell'autismo ($p = 0,009$), un aumento dei livelli di *Bifidobacterium longum* ($p < 0,001$) e una riduzione dei livelli di specie potenzialmente patogene, come *Clostridium spp.* ($p < 0,05$) [224]. Inoltre, sono state osservate la normalizzazione dei livelli di serotonina nel sangue e SCFA fecali e la riduzione dei livelli ematici di zonulina (un marcatore di permeabilità intestinale) ($p < 0,01$) [224].

Infine, in uno studio condotto da Pärtty et al., l'integrazione con *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG è stata eseguita per il suo potenziale ruolo preventivo nelle malattie dello sviluppo neurologico [225]. Settantacinque bambini sono stati randomizzati a ricevere il probiotico o il placebo per 6 mesi con un follow-up di 13 anni. I ricercatori hanno scoperto che, dopo 13 anni di follow-up, nessun bambino nel braccio probiotico ha sviluppato la sindrome di Asperger o disturbo da deficit di attenzione/iperattività (0%) rispetto al 17,1% nel braccio placebo ($p = 0,008$). Inoltre, i bambini con compromissione neurologica hanno mostrato una minore abbondanza significativa di bifidobatteri fecali nei primi sei mesi di vita rispetto ai bambini sani ($p = 0,03$) [225].

In una revisione sistematica del 2019 condotta da Qin Xiang et al. sugli effetti dei prebiotici/probiotici sui DSA e sui relativi sintomi associati, gli autori hanno osservato che la letteratura che supporta il ruolo dei probiotici nell'alleviare i sintomi GI o comportamentali negli individui con DSA è limitata. Questo è dovuto alla mancanza di un regime probiotico standardizzato, causata dalla varietà di specie, concentrazioni e durate di integrazione [226]. I risultati preliminari sull'integrazione probiotica nei DSA suggeriscono che questo approccio potrebbe ridurre la gravità dei sintomi dei DSA e affrontare le comorbidità GI, sfruttando la capacità dei probiotici di ridurre il potenziale infiammatorio del microbiota intestinale. Tuttavia, a causa dell'eterogeneità degli studi clinici, la possibilità di sviluppare una base solida di prove per trattamenti mirati rimane limitata fino ad oggi

Tabella 3. Supplementazione probiotica e sinbiotica in bambini con DSA (da Dargenio et al. modificato, 2023, [154]).

Referenze	Tipo di studio	Ceppi probiotici (dosi)	Durata	Dimensione del campione (N)	Popolazione di studio	Risultati principali
<i>Singolo</i>						
Parracho et al. (2010) [218]	Randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo	<i>L. plantarum</i> WCSF1 (4,5 × 10 ¹⁰ CFU/Capsula)	3 settimane	39	Bambini di 4-16 anni con ASD, Regno Unito	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Lattobacilli e Enterococchi, ↓ <i>Clostridium</i> cluster XIVa nelle feci • Migliorati i punteggi totali del comportamento (punteggi DBC-P) • Nessuna differenza importante nei sintomi gastrointestinali • Migliore consistenza delle feci
Kaluzna-Czaplinska et al. (2012) [219]	Prospettico open-label, no controlli	<i>L. acidophilus</i> Rosell-11 (5 × 10 ⁹ CFU/capsula)	Due volte al giorno per 2 mesi	22	Bambini di 4-10 anni con ASD, 90% maschi, Polonia	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Livelli di D-arabinitolo nelle urine (p < 0,05) prima e dopo il trattamento • ↓ D-arabinitolo e il rapporto di D-/L-arabinitolo nelle urine • Miglioramento della capacità di concentrarsi ed eseguire gli ordini
Partty et al. (2015) [225]	Randomizzato, controllato con placebo	<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103 (1 × 10 ¹⁰ CFU)	Una volta al giorno per 7 mesi (1 mese prima della consegna e 6 mesi dopo) Follow-up di 13 anni	75	Intervento infantile (n = 40) Controlli (n = 35), Finlandia	<ul style="list-style-type: none"> • A 13 anni, il 17,1% del braccio placebo aveva ADHD o sindrome di Asperger o ADHD rispetto allo 0% degli individui nel braccio probiotico (p = 0,008) • ↓ <i>Bifidobacterium</i> spp. nei bambini con compromissione neurologica a 6 mesi di età rispetto ai controlli (p = 0,03)
<i>Combinazioni</i>						
West et al. (2013) [220]	Prospettico open-label, no controlli	Delpro®: <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> +	Tre volte al giorno per 3 settimane	33	Bambini di 3-16 anni con problemi di ASD + GI, USA	<ul style="list-style-type: none"> • 48% dei partecipanti ↓ diarrea • 52% dei partecipanti ↓ stitichezza • L'88% dei partecipanti ha migliorato il comportamento (↓ punteggio ATEC)

		immunomodulatore Del-Immune V® (1 × 10 ⁸ CFU)				
Tomova et al (2015) [188]	Prospettico open-label, no controlli	3 specie di <i>Lactobacillus</i> , 2 specie di <i>Bifidobacteria</i> , 1 specie di <i>Streptococcus</i>	Tre volte al giorno per 4 mesi	29	Bambini di 2-9 anni con ASD (<i>n</i> = 10), Fratelli di 5-17 anni di bambini con ASD (<i>n</i> = 9), Bambini di controllo di 2-11 anni (<i>n</i> = 10), Slovacchia	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Bifidobatteri e <i>Desulfovibrio</i> spp. nelle feci • Normalizzazione Rapporto Bacterioides/Firmicutes • ↓ Fecale TNF-α
Shaaban et al. (2018) [221]	Prospettico open-label,	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Bifidobacteria</i> <i>longum</i> (100 × 10 ⁶ CFU)	Una volta al giorno per 3 mesi	30	Bambini di 5-9 anni con ASD (<i>n</i> = 30, 63% maschio), Controlli (<i>n</i> = 30, età/sexo corrispondenti), Egitto	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Bifidobatteri e lattobacilli nelle feci • Miglioramento del comportamento (↓ punteggi ATEC) • ↓ Severità totale dei sintomi gastrointestinali (6 punteggi GSI)
Arnold et al. (2019) [222]	Randomizza to, controllato con placebo cross-over pilot study	Visbiome® (formerly VSL#3) <i>L.</i> <i>acidophilus</i> , <i>L.</i> <i>plantarum</i> ; <i>L. para-</i> <i>casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. Bulgaricus</i> , <i>Streptococcus</i> <i>thermophiles</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>breve</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>infantis</i> (90 × 10 ¹⁰ CFU/bustina)	Due volte al giorno per 8 settimane	13	Bambini di 3-12 anni con ASD + ansia + FGID	<ul style="list-style-type: none"> • Punteggio GI PedsQL temporaneamente migliorato (<i>p</i> = 0,14) • ↓ Sintomi di gastrointestinali mirati ai genitori (<i>p</i> = 0,02) • Nessun cambiamento nella diversità del microbioma intestinale o nella composizione a livello familiare delle specie
Santocchi et al. (2020) [223]	Randomizza to, controllato con placebo	Visbiome® (formerly VSL#3) <i>L.</i> <i>acidophilus</i> , <i>L.</i> <i>plantarum</i> ; <i>L. para-</i> <i>casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. Bulgaricus</i> , <i>Streptococcus</i> <i>thermophiles</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>breve</i> ,	6 mesi: due pacchetti/giorn o per 4 settimane, un pacchetto/gior no per 5 mesi	63	Bambini di 18-72 mesi con ASD (<i>n</i> = 31), Controlli con ASD (<i>n</i> = 32, età/sexo abbinati), Italia	<ul style="list-style-type: none"> • Nessuna variazione significativa nel punteggio di gravità dell'ASD (punteggio ADOS-CSS) • Nessuna differenza significativa nei biomarcatori del sangue (IL-6, TFN-α±) o nella calprotectina fecale <p>Analisi del sottogruppo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nessun gruppo GI, <i>n</i> = 46 • Punteggi totali di gravità autistica (ADOS) (<i>p</i> = 0,026) • gruppo GI, <i>n</i> = 17 • gravità GI totale (<i>p</i> = 0,0191), odore di feci (<i>p</i> < 0,001) e flatulenza (<i>p</i> = 0,0187)

		<i>Bifidobacterium infantis</i>				
		(450 miliardi CFU/bustina)				

ASD, Sindrome dello spettro autistico; ADOS, Autistic Symptoms and Subthreshold Score; ATEC, Autism Treatment Evaluation Checklist Structure; BCP, Bovine Colostrum Product; CFU, Colony Forming Unit; DBC, Developmental Behavior Checklist; FGID, Functional GI Disorders; FOS, fructo-oligosaccharidi; GI, gastrointestinali; 6-GSI, 6-Item Gastrointestinal Severity Index; IL, interleuchina; *L.*, *Lactobacillus*; PedsQL, Pediatric Quality of Life Inventory; SCFAs, acidi grassi a catena corta; TNF- α , tumore necrosi factor alpha; ® marchio registrato; ↑ aumentato; ↓ diminuito.

1.5.2. *Limosilactobacillus reuteri* nei DSA

Un tema cruciale è rappresentato dalla possibilità di poter identificare il ceppo che media l'azione clinica. Tra le specie batteriche più ampiamente studiate, con risultati positivi riportati nella letteratura scientifica, è la specie batterica commensale *L. reuteri*, precedentemente noto come *Lactobacillus reuteri* [227]. Si è osservato che la specie batterica in questione ha invertito selettivamente i deficit sociali in un modello murino di dieta materna ricca di grassi per i disturbi dello sviluppo neurologico [186].

Studi successivi volti ad analizzare i meccanismi con cui i batteri modulano il comportamento sociale hanno rivelato che *L. reuteri* inverte i deficit sociali nei modelli murini di DSA con un meccanismo di tipo vagale (*L. reuteri* risulta difatti inefficace nei topi vagotomizzati). Il nervo vago proietta al nucleo paraventricolare, dove viene prodotta ossitocina; *L. reuteri* promuove quindi la ricompensa sociale prendendo come target il circuito di ricompensa ossitocina-dopaminergico [228, 229], un pathway critico coinvolto nei comportamenti sociali [230, 231]. Inoltre, *L. reuteri* non ha alterato significativamente la composizione complessiva del microbioma in modelli murini per DSA ed era da solo sufficiente a invertire i deficit sociali nei topi privi di microbiota [229]. Ciò evidenzia che l'effetto di *L. reuteri* sul comportamento sociale è indipendente da altri microbi nell'intestino. Recentemente è stato osservato che *L. reuteri* ha invertito i deficit sociali in assenza di un sistema immunitario adattativo maturo, indicando che il suo effetto pro-sociale è probabilmente indipendente dalle cellule B e T [232]. È importante sottolineare che questi risultati preclinici sono generalizzabili a modelli per DSA con diverse eziologie sottostanti, ad esempio, genetiche, idiopatiche e ambientali [228, 229], e sono stati riprodotti da diversi ricercatori [233, 234].

Gli effetti benefici di *L. reuteri* sembrano essere selettivi per il comportamento sociale poiché i batteri non riescono a invertire altri deficit comportamentali (ad esempio, comportamento ripetitivo,

cambiamenti nei livelli di attività, comportamento correlato all'ansia) nei modelli murini di DSA [186, 228, 229]. La Food and Drug Administration ha certificato il *L. reuteri* come "Generally Recognized as Safe" (GRAS) per l'uso nell'uomo ed infine questo ceppo è già stato somministrato in modo sicuro ai neonati entro i primi 3 mesi di vita [235].

2. STUDIO SPERIMENTALE

2.1. Obiettivi dello studio

L'obiettivo principale di questo studio pilota è stato quello di valutare gli effetti della supplementazione con un ceppo probiotico specifico nei bambini con DSA, concentrandosi su uno dei deficit più distintivi del disturbo, ovvero le difficoltà nelle interazioni sociali. L'obiettivo secondario dello studio è stato esaminare i possibili impatti dell'integrazione probiotica su determinati sintomi gastrointestinali e comportamenti ripetitivi o disfunzionali tipici nei bambini con DSA. L'analisi del microbiota intestinale e del profilo immunologico prima e dopo la supplementazione probiotica ha permesso di esplorare il possibile ruolo del microbiota e del sistema immunitario nel determinare gli effetti benefici del trattamento con probiotici. Inoltre, sono state esaminate le modifiche concomitanti nel profilo microbiotico e immunitario per identificare eventuali biomarcatori utili a distinguere i pazienti che rispondono o non rispondono al trattamento probiotico. Un ulteriore braccio dello studio ha incluso l'arruolamento di fratelli a sviluppo tipico di bambini con DSA, per un'analisi più dettagliata dei dati ottenuti dalle indagini immunologiche, microbiotiche e metabolomiche e per ottenere profili di espressività endofenotipica distinti; tuttavia, questa parte non verrà trattata nel presente lavoro di tesi. Lo studio ha coinvolto l'Unità Operativa di Gastroenterologia Pediatrica dell'Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", l'Unità Operativa di Neuropsichiatria Infantile del Policlinico di Tor Vergata, a Roma, e l'Unità di Neuroimmunologia Molecolare della Fondazione Santa Lucia di Roma..

2.2. Materiali e metodi

2.2.1. Disegno dello studio

Studio prospettico, in doppio cieco, randomizzato 1:1, controllato con placebo, con un integratore alimentare a base di una miscela di due ceppi probiotici (*L. reuteri* ATCC PTA 6475, *L. reuteri* DSM 17938): per una durata complessiva di sei mesi (Figura 2). Le due preparazioni erano indistinguibili una dall'altra

Al tempo T0, prima della randomizzazione, ogni paziente è stato sottoposto a valutazione neuropsichiatrica cognitiva, comportamentale e adattiva; inoltre sono stati raccolti campioni biologici (sangue, urine e feci). La raccolta dei campioni biologici ha coinvolto anche i fratelli sani, con prelievo ematico, raccolta di urine e feci, una tantum nel corso dell'intero progetto. Inoltre, prima di iniziare la supplementazione, a ciascuna famiglia è stato chiesto di compilare un diario alimentare dettagliato, descrivendo qualità e quantità di tutti i cibi consumati dai bambini per sette giorni consecutivi; questa indagine è servita a raccogliere le informazioni sul grado di selettività alimentare

dei soggetti coinvolti nello studio, allo scopo di confrontare questa informazione con il profilo di sintomi gastrointestinali e, in un secondo momento, con la composizione del microbiota.

A distanza di tre mesi dall'inizio della supplementazione (al tempo T1), sono stati somministrati alcuni questionari di valutazione ai genitori dei bambini ed è stata effettuata una nuova raccolta di campioni biologici.

Alla fine dello studio, a sei mesi dall'inizio dell'assunzione del probiotico (T2), i bambini con DSA sono stati sottoposti ad una nuova valutazione degli aspetti clinici, sintomatologici e comportamentali, nonché alla raccolta di campioni biologici, per valutare i possibili cambiamenti a livello di: (1) gravità dei sintomi core dell'autismo; (2) sintomi affettivi e comportamentali; (3) gravità dei sintomi GI; (4) modulazione del microbiota intestinale e (5) biomarcatori plasmatici, urinari e fecali correlati alla disfunzione intestinale/infiammatoria (Figura 2).

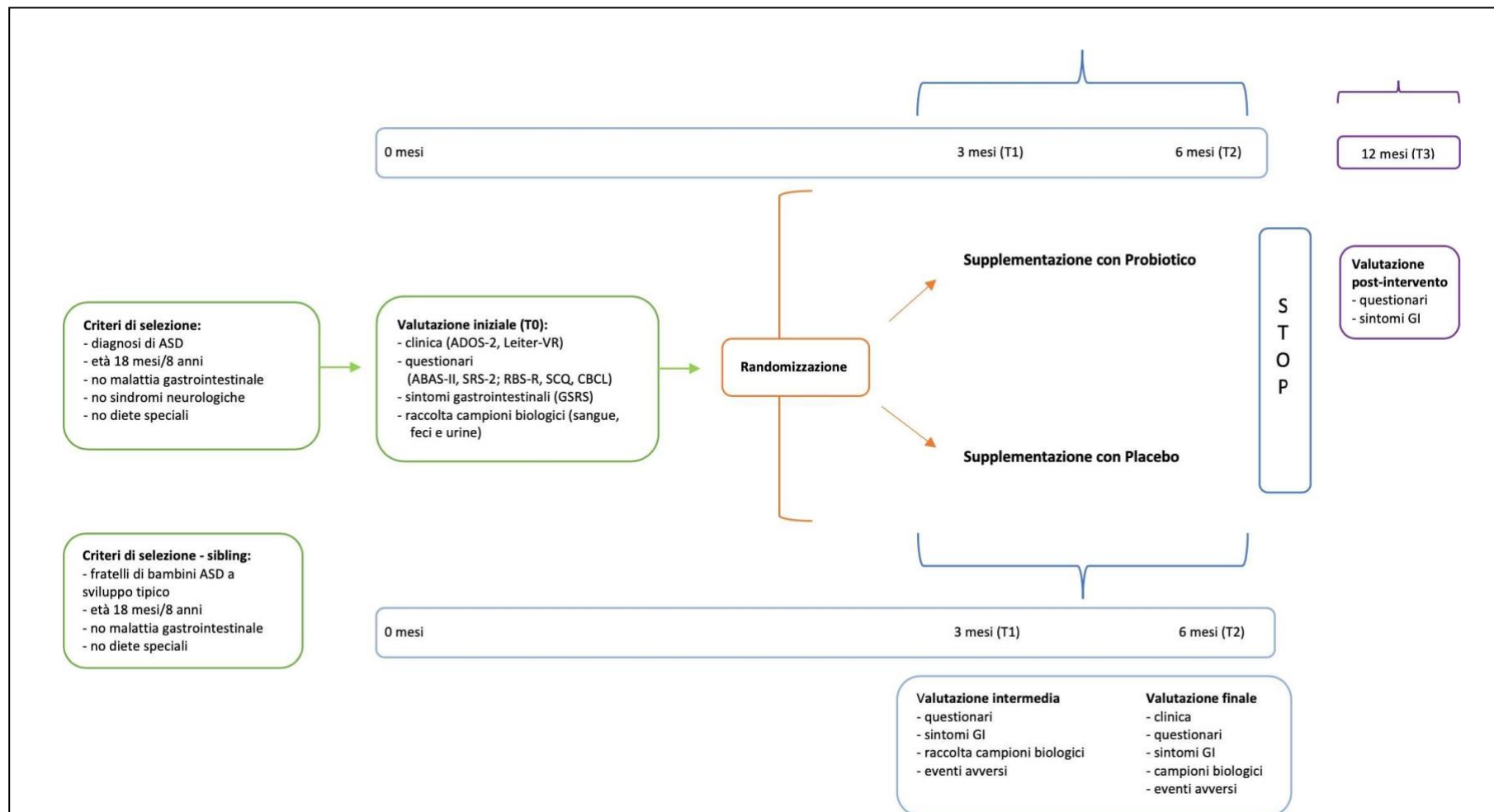


Figura 2. Disegno dello studio

ASD: Disturbo dello Spettro Autistico; DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders -5th edition; GI: gastrointestinal; ADOS-2: Autism Diagnostic Observational Schedule – 2nd edition; ABAS: Adaptive Behavior Assessment System – II edition; RBS: Repetitive Behavior Scale; SRS: Social Responsiveness Scale; SCQ: Social Communication Questionnaire; CBCL: Children Behavior CheckList.

2.2.2. Partecipanti

I criteri di inclusione dei pazienti nello studio sono stati i seguenti: bambini con diagnosi di DSA idiopatico; soggetti di entrambi i sessi; fascia di età 18 mesi–8 anni.

Il motivo per cui sono stati inclusi pazienti fino agli 8 anni di età si basa sulla maggior efficacia degli interventi precoci sui sintomi core del DSA, fortemente raccomandati dalla letteratura scientifica [236], nonché sul riscontro che soggetti con DSA in età infantile sembrano trarre maggior beneficio da una terapia probiotica rispetto ai soggetti di maggiore età [237].

Sono invece stati adottati come criteri di esclusione la presenza di una o più delle seguenti condizioni: sindromi neurologiche; sindromi genetiche; diagnosi di disturbo GI organico (es. malattia celiaca); dieta speciale; trattamento farmacologico in atto; patologie infettive/autoimmuni in atto.

La ragione per cui sono stati esclusi dalla popolazione oggetto di studio soggetti con quadri neurologici e genetici di base è stata quella di rendere il più possibile omogeneo il campione rispetto a particolari endofenotipi di presentazione del disturbo, diversi dai quadri idiopatici. L' esclusione dei bambini sottoposti a diete speciali, in trattamento farmacologico o con patologie infettive/immuni è invece dovuta alle possibili interferenze che queste condizioni avrebbero potuto avere sul microbiota, sui sintomi GI durante la supplementazione probiotica.

2.2.3. Intervento

L'azienda di biotecnologie svedese Biogaia (specializzata in sviluppo e vendita di probiotici) ha fornito a titolo gratuito la formulazione in cui è presente il ceppo batterico di nostro interesse, nonché il placebo, per tutta la durata dello studio. La miscela probiotica è attualmente registrata in Italia sotto il nome di Gastrus® e contiene due ceppi specifici di *L. reuteri*, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 (1×10^8 unità formanti colonie, CFU) e *L. reuteri* DSM 17938 (1×10^8 CFU).

Il dosaggio previsto è stato di 2 compresse al giorno, per un totale di circa 400 milioni di CFU/die, sulla base di indicazioni tratte da precedenti studi pediatrici riguardanti il trattamento di disturbi GI in bambini a sviluppo tipico [235]. Sono state date alle famiglie indicazioni riguardo alla corretta modalità di conservazione delle compresse in ambiente domestico e sono state fornite istruzioni sulla loro somministrazione: è stato consigliato di far assumere ai bambini le compresse direttamente come tali o disciolte in un alimento o in un liquido freddo (non gassato, né acido). Le due preparazioni, probiotico e placebo, sono state confezionate in formato identico, indistinguibili una dall'altra; entrambi i prodotti erano aromatizzati al sapore di menta e mandarino.

Durante i sei mesi di supplementazione, alle famiglie è stato richiesto di annotare e comunicare all'equipe di ricerca qualsiasi effetto avverso, interruzione del trattamento o assunzione di altri farmaci/integratori alimentari.

Inoltre, nel corso della stessa fase dello studio, è stato concordato con i caregiver di non somministrare ai bambini altri preparati probiotici e di mantenere il più possibile stabile l'intervento terapeutico già in atto, sia in termini di tipologia che di durata del trattamento abilitativo. Queste indicazioni sono state fornite per ridurre al minimo l'influenza di altri fattori che avrebbero potuto complicare l'attribuzione degli effetti della supplementazione.

2.2.4. Valutazione comportamentale

Al tempo T0, tutti i bambini sono stati sottoposti ad una valutazione neuropsichiatrica cognitiva, comportamentale e adattiva completa.

La valutazione ha incluso l'assessment standardizzato del livello cognitivo non verbale, della severità dei sintomi dell'autismo, del funzionamento adattivo, di specifici deficit sociocomunicativi, di problematiche psicologiche e comportamentali, del profilo sensoriale dei bambini.

Sono stati utilizzati i seguenti strumenti:

-Leiter-R: la Leiter International Performance Scale–Revised è un test realizzato per la valutazione delle funzioni cognitive in bambini e adolescenti di età compresa tra i 2 anni e 0 mesi ed i 20 anni e 11 mesi [238]. La batteria Visualizzazione e Ragionamento (VR) prevede dieci sub-test per le abilità intellettive non verbali correlate alla visualizzazione, al ragionamento e all'abilità spaziale. Le abilità cognitive non verbali non richiedono capacità di percepire, di manipolare e di ragionare con parole o numeri, con materiali stampati o con qualunque altro materiale tradizionalmente identificato come “verbale”; esse vengono testate attraverso figure, illustrazioni figurate e simboli in codice, e tutte le istruzioni di somministrazione prevedono modalità non verbali (gestuale e mimica); questo test pertanto è estremamente utile nella valutazione del quoziente intellettivo di soggetti con difficoltà comunicative, come ad esempio i soggetti con DSA. Nel contesto dello studio, il test cognitivo non verbale è stato somministrato ai bambini DSA solo al tempo T0, non essendo il livello cognitivo tra le misure di efficacia dell'intervento, ma costituendo piuttosto una delle caratteristiche cliniche da indagare per sottotipizzare la popolazione dei pazienti facenti parte del campione.

-ADOS-2: Autism Diagnostic Observation Schedule–second edition, una valutazione standardizzata e semi strutturata degli aspetti di comunicazione, dell'interazione sociale, del gioco e dell'uso immaginativo di materiali per individui con sospetta o accertata diagnosi di Disturbo dello spettro autistico [239]. L'ADOS-2 comprende cinque moduli di valutazione, ciascuno con attività dirette alla stimolazione di comportamenti significativi ai fini della diagnosi di DSA, in base ai diversi livelli di sviluppo, età cronologica e livello linguistico. Le attività somministrate ai bambini sono suddivise in riferimento a cinque categorie: “A. Linguaggio e comunicazione”, “B.

Interazione sociale reciproca”, “C. Immaginazione e Creatività”, “D. Comportamenti stereotipati ed interessi ristretti” e “E. Altri comportamenti anormali”. I punteggi sono invece organizzati in due aree principali: Affetto Sociale (AS) che comprende Comunicazione ed Interazione Sociale Reciproca; Comportamento Ristretto e Ripetitivo (CRR). Ciascun modulo presenta uno o due algoritmi diagnostici con specifici punteggi cut-off per determinare la categoria classificativa di autismo, spettro autistico, non-spettro (derivanti dalla precedente definizione del DSM-IV). Inoltre, per i moduli da 1 a 3 può essere ottenuto un punteggio di comparazione (CSS): tale valore numerico, compreso tra 1 e 10, costituisce un modo per indicare il livello di intensità della sintomatologia correlata allo spettro autistico, osservata durante l’ADOS-2, confrontandola con quella di bambini con la medesima diagnosi, età e livello di linguaggio. Inoltre, il CSS può essere inoltre utilizzato per confrontare variazioni della sintomatologia autistica in valutazioni effettuate a distanza di tempo.

-ABAS-II: il test Adaptive Behavior Assessment System – second edition, una scala di valutazione del comportamento che misura le abilità di vita quotidiana, ossia ciò che i soggetti effettivamente sono capaci di fare in autonomia, senza l'aiuto degli altri [240]. È in grado di rilevare tali abilità in soggetti di età compresa tra 0 e 89 anni, che presentano disturbi del neurosviluppo, disabilità intellettiva, problemi neuropsicologici, etc. L’intero test è strutturato in 5 questionari che devono essere compilati dal soggetto stesso o da alcune figure di riferimento (insegnanti, genitori, familiari, caregiver o altre persone che partecipano alle attività quotidiane dell’individuo), che possono verificare la presenza e la frequenza dei comportamenti.

Lo strumento indaga 10 aree adattive, riconducibili a 3 domini: Concettuale (DAC): Comunicazione, Competenze prescolari/scolastiche, Autocontrollo; Sociale (DAS): Gioco/Tempo libero, Socializzazione; Pratico (DAP): Cura di sé, Vita a casa/scuola, Uso dell'ambiente, Salute e sicurezza, Lavoro. A queste si aggiunge l'area Motricità, limitata alla valutazione di bambini da 0 a 5 anni.

-RBS-R: il test Repetitive Behavior scale–Revised, valuta i comportamenti ristretti e ripetitivi tramite un questionario di valutazione compilato dal genitore [241]. È costituita da 43 item, a cui si assegna un punteggio secondo una scala Likert da 0 a 3. I punteggi sono organizzati in sottoscale: comportamenti stereotipati, comportamenti autolesivi, comportamenti compulsivi, comportamenti ritualistici, interessi ristretti e ripetitivi.

-SRS: il Social Responsiveness Scale, una scala di valutazione del comportamento sociale reciproco, della comunicazione e dei comportamenti ripetitivi e stereotipati caratteristici dei disturbi dello spettro autistico, in soggetti tra i 4 e i 18 anni [242]. La SRS è un questionario composto da 65 items ed esiste in due forme, una che può essere compilata da un insegnante,

l'altra da un genitore o da un altro caregiver. Tale strumento fornisce la misura della gravità del deficit sociale. La SRS fornisce inoltre informazioni utili per realizzare e valutare programmi di trattamento, tramite cinque sottoscale: consapevolezza sociale, cognizione sociale, comunicazione sociale, motivazione sociale e manierismi autistici.

-SCQ: il test Social Communication Questionnaire, un questionario che aiuta a valutare le capacità comunicative, sociali e relazionali di bambini con sospetto o diagnosi di DSA [243]. Sono previste due forme, "arco di vita" (la forma da utilizzare a scopo di screening, compilata facendo riferimento all'intera storia di sviluppo del soggetto) e "ultimi 3 mesi" (la forma da utilizzare per rilevare cambiamenti nel tempo di soggetti già diagnosticati) ambedue costituite da 40 item a risposta dicotomica. Nel protocollo di studio è stata utilizzata la versione "ultimi 3 mesi" dello strumento.

-CBCL: il test Child Behavior CheckList, uno dei questionari maggiormente utilizzati per la valutazione delle competenze e dei problemi emotivi e comportamentali dei bambini e degli adolescenti [244]. Il questionario, compilato dai genitori, è disponibile in due versioni a seconda della fascia d'età del bambino (prescolare: 18 mesi-5 anni e scolare: 6-18 anni). Il test indaga ad ampio spettro la psicopatologia in età evolutiva attraverso scale che valutano dimensioni specifiche (es. Ritiro/Depressione, Lamentele Somatiche, Comportamenti Aggressivi, etc) e generali (Disturbi internalizzanti e Disturbi esternalizzanti). I problemi emotivo-comportamentali possono inoltre essere investigati attraverso scale "DSM-oriented", che consentono al clinico e al ricercatore di orientarsi nella valutazione basata su alcune delle categorie diagnostiche del DSM.

- PSI: il questionario Parenting Stress Index, uno strumento che indaga l'eventuale presenza di sistemi stressanti all'interno della relazione bambino-genitore e permette di rilevare il livello di stress genitoriale, identificando se e quanto tale fattore stia interferendo nella relazione di accudimento [245]. Il test distingue cinque aree: Distress Genitoriale, Interazione genitore-bambino disfunzionale, Bambino Difficile, Stress Totale e Risposte Difensive.

- SSP: il test Short Sensory profile, un questionario compilato dai genitori che identifica la presenza di variazioni o difficoltà nel processamento sensoriale dei bambini [246]. Contiene 38 item, organizzati in sette sottoscale: Sensibilità Tattile, Sensibilità Gustativa e Olfattiva, Sensibilità al movimento, Iporesponsività/Ricerca di Sensazioni, Filtraggio Uditivo, Bassa Energia/Debolezza, Sensibilità Visiva/Uditiva. Anche questo test, così come la scala Leiter-VR, è stato effettuato solo durante l'assessment iniziale (tempo T0) allo scopo di descrivere al meglio il fenotipo clinico della popolazione oggetto di studio.

Per la valutazione neuropsichiatrica, l'efficacia dell'intervento oggetto di studio sul profilo clinico-comportamentale dei bambini con DSA è stata valutata confrontando i punteggi ottenuti

nelle valutazioni comportamentali tra i due gruppi di bambini, prima e dopo l'integrazione di probiotici o placebo. Gli strumenti presi in considerazione sono stati la scala ADOS-2 e i test ABAS-II, SRS, SCQ, scelti in base alla loro capacità di indagare specificamente le abilità sociali nella popolazione con DSA [247].

Inoltre, sono state indagate eventuali modifiche delle problematiche comportamentali globali (tramite il test CBCL), delle stereotipie e comportamenti ripetuti (tramite il test RBS-R), il grado di stress genitoriale (tramite il test PSI).

2.2.5. Valutazione dei sintomi gastrointestinali

Per la valutazione della sintomatologia GI è stato utilizzato il questionario GSRS, Gastrointestinal Symptoms Rating Scale [248], uno strumento designato per valutare la presenza di problematiche GI. Il test indaga la presenza di 15 segni e sintomi indicativi di disturbi GI, usando una scala Likert a sette punti: il punteggio più alto, 7, sta ad indicare l'intensità maggiore dei sintomi, mentre 1 denota l'assenza di sintomi. Il punteggio totale viene poi convertito nella fascia di intensità corrispondente: minima, bassa, moderata o grave.

2.2.6. Raccolta e conservazione dei campioni biologici

All'inizio dello studio (tempo T0) sono stati raccolti campioni biologici (sangue, urine e feci) da ciascun partecipante al fine di eseguire la valutazione immunologica, microbiologica e metabolomica in ambiente ospedaliero. Invece, la raccolta di campioni di urine e feci è avvenuta in ambito domestico, con successiva consegna dei campioni ai ricercatori. La raccolta dei campioni biologici ha coinvolto anche i fratelli, con prelievo ematico e raccolta di urine e feci, una tantum nel corso dell'intero progetto.

A distanza di 3 mesi dall'inizio della supplementazione (al tempo T1) e alla fine dello studio, a sei mesi dall'inizio dell'assunzione del probiotico (T2), i bambini con DSA sono stati sottoposti nuovamente alla raccolta di campioni biologici (sangue, feci e urine).

I campioni biologici (feci e urine) prelevati in ambito domestico, raccolti e resi anonimi (mediante l'assegnazione di un numero identificativo) sono stati conservati in un frigo a -25°. I campioni biologici (sangue) sono stati raccolti in ambito ospedaliero tramite venopunzione: 5 ml circa di sangue in una provetta da siero, 5 ml circa di sangue in una provetta da plasma. Il sangue nella provetta da siero è stato ultracentrifugato a 1600 rpm in una centrifuga standard per 10 minuti per separare siero da parte corpuscolata; dopodiché il siero è stato conservato in provette eppendorf da 1 ml l'una, rese anonime e conservate a -25°. Successivamente, anche questi campioni sono stati inviati per le analisi microbiotiche e metabolomiche. I campioni di sangue contenuti nelle provette da plasma sono stati

invece conservati a temperatura ambiente e consegnati, entro 24 ore da ciascun prelievo, per l'analisi immunologica.

2.2.7. Analisi del microbiota intestinale

I campioni fecali sono stati raccolti in contenitori sterili dai genitori dei bambini e sono stati consegnati ai ricercatori, che hanno provveduto a conservarli ad una temperatura di -25°C . Per quanto riguarda la metodica di analisi di studio del microbiota fecale dei bambini con DSA, è stato utilizzato un approccio metagenomico basato sull'amplificazione e sul sequenziamento di una porzione del gene batterico 16SrRNA. Il DNA è stato estratto dalle feci utilizzando protocolli stabiliti. Un amplicone (frammento di RNA prodotto di reazioni di amplificazione) panbatterico è stato prodotto bersagliando le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S rRNA. Il sequenziamento è stato infine eseguito utilizzando un approccio paired-end (2 x 300 bp) su Illumina Piattaforma MiSeq. Le sequenze grezze sono state analizzate utilizzando una consolidata pipeline bioinformatica, per lo più basata sul software Mothur.

Dopo il controllo di qualità, le letture risultate valide sono state raggruppate in unità tassonomiche operative (OTU) al 97% di omologia. L'attribuzione tassonomica delle OTU è stata ottenuta rispetto alle banche dati di riferimento.

Dopodiché, sul microbiota sono state eseguite analisi di comunità (es. diversità nella composizione tra campioni con analisi di correlazione relativa, analisi di clustering, indici ecologici di copertura e ricchezza, metriche di diversità alfa e beta), considerando diversi livelli tassonomici. Particolare attenzione è stata riservata ai risultati già disponibili sulla composizione complessiva della popolazione batterica nei pazienti con DSA e sui taxa batterici per i quali sono state riportate variazioni significative nell'abbondanza.

L'alfa diversity misura la variabilità delle specie all'interno di un campione. Questa misura tiene in considerazione sia la ricchezza delle specie, ossia il numero di specie differenti all'interno dell'ecosistema considerato, sia l'uniformità, che misura l'omogeneità nell'abbondanza delle differenti specie nel campione. Una diversità microbica maggiore è spesso associata a un migliore stato di salute: ad esempio, la complessità microbica (e quindi l'alfa diversity) in pazienti affetti da malattie infiammatorie intestinali è significativamente più bassa rispetto a quella di soggetti sani.

L'analisi dell'alfa diversity è stata ottenuta con l'indice di diversità di Shannon (H), misura del numero totale di specie riscontrate all'interno del singolo campione (richness) ed espressione della differenza di abbondanza tra le differenti specie (diversity). Inoltre, è stata utilizzata la Phylogenetic Diversity, una misura della biodiversità che incorpora la differenza filogenetica tra le specie.

Per quanto riguarda la beta diversity, questa misura tiene conto delle differenze nella composizione tra due campioni. Tra le varie misure a disposizione è importante citare la distanza UniFrac, una metrica di distanza utilizzata per confrontare le comunità biologiche: incorpora informazioni sulla parentela relativa dei membri della comunità prendendo in considerazione le distanze filogenetiche tra gli organismi osservati nel calcolo. Sia la variante pesata (quantitativa) che quella non pesata (qualitativa) di UniFrac sono ampiamente utilizzate in ecologia microbica, dove la prima (weighted) rappresenta l'abbondanza di organismi osservati, mentre la seconda (unweighted) considera solo la loro presenza o assenza.

La beta diversity calcola il numero di specie che non sono le stesse in due ambienti diversi. Un indice di diversità beta alto indica un basso livello di somiglianza, mentre un indice di diversità beta basso mostra un alto livello di somiglianza. In questo modo, individui che hanno un microbiota composto da batteri differenti ma vicini dal punto di vista filogenetico, saranno più simili rispetto ad individui con un microbiota composto da specie distanti filogeneticamente. La valutazione è stata effettuata mediante un grafico a gradiente normalizzato usando metodi appartenenti all'Analisi del Trend Principale (PTA): Centered Log-Ratio transformation (CLR) e Principal Coordinate Analysis (PCoA).

2.2.8. Analisi statistica

Le differenze nei punteggi ottenuti nelle valutazioni cognitive e comportamentali tra i due gruppi di bambini, prima e dopo l'integrazione con probiotici o placebo, sono state analizzate mediante analisi statistiche univariate e multivariate. Valori di p uguali o minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Inoltre, in una seconda fase, i risultati derivanti dalle analisi neuropsichiatriche, microbiologiche, neuroimmunologiche e metabolomiche sono stati e saranno integrati utilizzando strumenti bioinformatici, per sviluppare un modello che predica la risposta al trattamento probiotico sulla base delle caratteristiche individuali identificate da biomarker immunologici, metabolomici e microbiologici.

In particolare, i dati saranno analizzati mediante tecniche statistiche multivariate comprendenti l'analisi delle componenti principali (PCA) e il metodo supervisionato, denominato analisi discriminante dei minimi quadrati ortogonali (OPLS-DA). Attraverso la caratterizzazione multiparametrica dei pazienti con DSA si cercherà di identificare una firma specifica associata ai miglioramenti nel comportamento sociale.

2.2.9. Consenso informato

Ai genitori di tutti i bambini con DSA è stato spiegato in dettaglio l'obiettivo dello studio, le modalità di partecipazione e lo svolgimento delle attività previste. Un ulteriore consenso informato è stato richiesto per l'inclusione dei fratelli nello studio.

Al termine dei colloqui, è stato firmato il consenso informato, di cui è stata fornita una copia a ciascuna famiglia.

2.3. Risultati

2.3.1. Popolazione oggetto di studio

Sono stati arruolati 43 pazienti con ASD, suddivisi come di seguito elencato (Figura 3): 21 pazienti nel gruppo *L. reuteri* (età media $5,8 \pm 1,3$ anni) (19 maschi) e 22 pazienti nel gruppo placebo (età media $5,5 \pm 1,2$ anni) (16 maschi/6 femmine)

Sei famiglie hanno ritirato i bambini dallo studio in corso d'opera, prima della somministrazione del prodotto. Di queste, tre famiglie hanno cambiato idea sulla partecipazione allo studio a causa della pandemia Covid-19. Due famiglie hanno preferito evitare di sottoporre i bambini a prelievi ematici ripetuti (tre in 6 mesi); infine, un soggetto con DSA è stato sottoposto a dieta aglutinata per decisione autonoma familiare, pertanto, non ha potuto proseguire lo studio.

La tabella 4 riassume le caratteristiche demografiche e gli score clinici al basale dei due gruppi.

Figura 3. Il diagramma di flusso dello studio clinico.

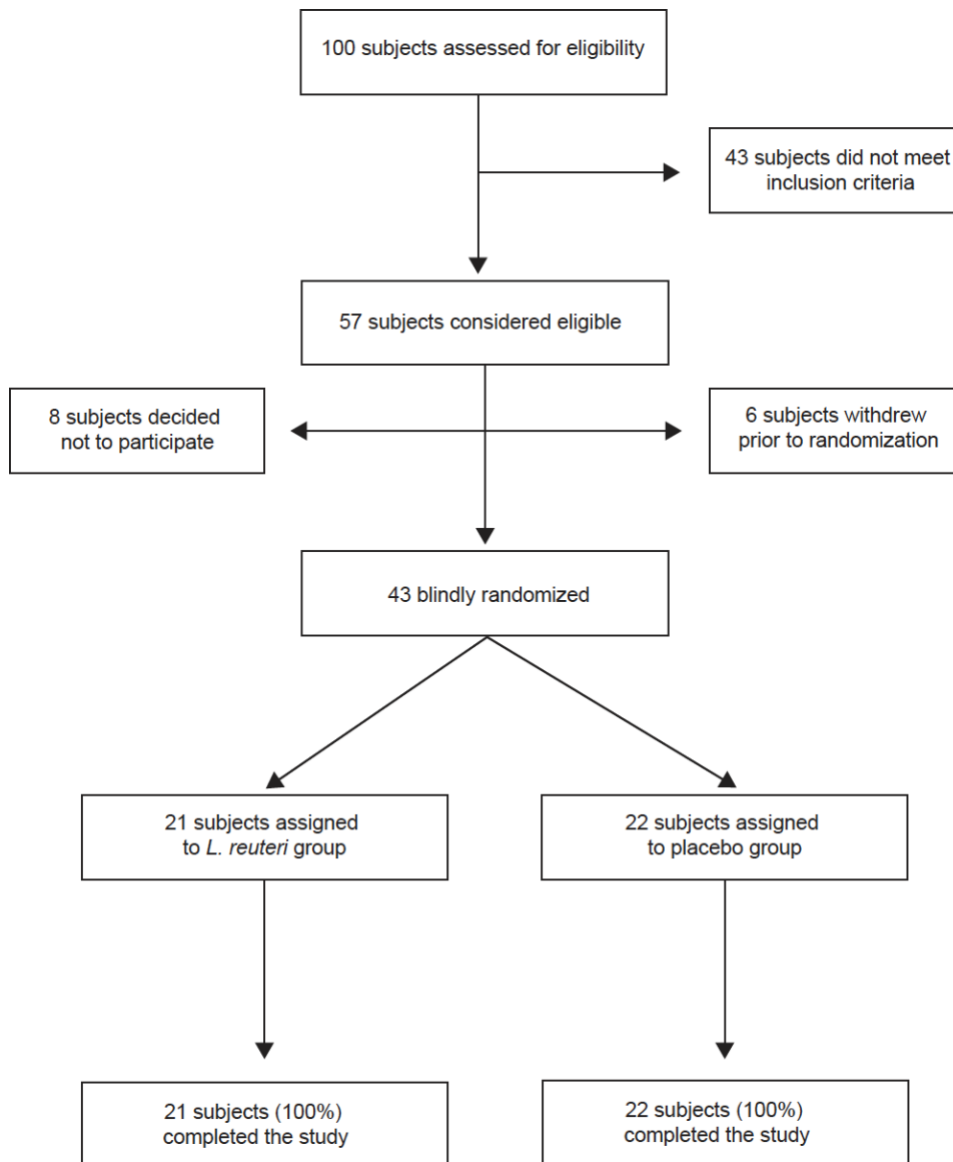


Tabella 4. Confronto al basale tra i gruppi di controllo e di trattamento

	Control	Treatment
<i>n</i>	22	21
Male/female sex, <i>n</i>	16/6	19/2
Age, mean (SD), years	5.94 (1.29)	6.23 (1.15)
NVIQ, mean (SD)	88.95 (21.32)	95.19 (25.05)
ADOS-2 Total CSS, mean (SD)	7.13 (0.82)	6.75 (1.62)
SRS Total T-Score, mean (SD)	84.59 (16.90)	88.50 (17.86)
CBCL Internalizing Score, mean (SD)	62.33 (8.21)	61.20 (9.88)
CBCL Externalizing Score, mean (SD)	56.62 (8.75)	59.45 (12.51)
ABAS-2 GAC Score, mean (SD)	58.23 (15.44)	58.60 (12.45)
PSI/SF Total Score, mean (SD)	67.50 (22.27)	68.30 (28.10)
GSRS Total Score, mean (SD)	5.10 (3.39)	6.35 (4.89)

NVIQ = Non-verbal Intelligence Quotient; ADOS-2 = Autism Diagnostic Observation Schedule, Second Edition; CSS = Calibrated Severity Score; SRS = Social Responsiveness Scale; Total T Score = gender-normalized total score; CBCL = Child Behavior Checklist; ABAS-2 = Adaptive Behavior Assessment System, Second Edition; GAC= General Adaptive Composite; PSI/SF = Parenting Stress Index Short Form; GSRS = Gastrointestinal Symptoms Rating Scale; no statistical difference observed between the two groups on any above variables.

2.3.2. Effetti del trattamento con *L. reuteri* nell'uomo: esiti comportamentali

Considerando l'obiettivo primario, non sono stati osservati miglioramenti sulle misure della gravità complessiva dei sintomi come valutato dal punteggio di gravità calibrato totale ADOS-2 (Tabella 5). È importante sottolineare che le analisi secondarie di efficacia hanno rivelato che 6 mesi di trattamento con *L. reuteri* hanno migliorato i comportamenti sociali misurati dal SRS total T-Score (Tabella 5).

Il funzionamento sociale è un dominio complesso e sfaccettato, che comprende sottodomini con eziologie almeno parzialmente distinte che possono rispondere in modo diverso a trattamenti diversi. Pertanto, abbiamo cercato di determinare se *L. reuteri* avesse effetti simili in diversi sottodomini sociali che abbiamo identificato in una recente analisi fattoriale su larga scala [249] in linea con gli obiettivi della Research Domain Criteria Initiative del National Institute of Mental Health [250]. Conformemente, sono stati osservati miglioramenti nel sottodominio Comunicazione Sociale ma non nei sottodomini Motivazione Sociale o Comprensione dello Stato Mentale. Si è potuto apprezzare, coerentemente con i risultati dell'SRS, un miglioramento significativo nel sottodominio del funzionamento sociale adattivo (misurato dal punteggio composito adattivo sociale dell'ABAS-2) nei

partecipanti che hanno ricevuto *L. reuteri* rispetto al placebo. Il segnale positivo era specifico per il funzionamento sociale, dato che non sono stati osservati miglioramenti su altre misure di esito secondarie che valutano comportamenti ripetitivi limitati, psicopatologia generale, aspetti non sociali del funzionamento adattivo, stress genitoriale e sintomatologia GI come valutato dai punteggi della sottoscala RBS-R, CBCL che internalizza ed esternalizza i punteggi dei problemi, ABAS, punteggio totale PSI/Short Form e punteggio totale GSRS (Tabella 4). Pertanto, il trattamento con *L. reuteri* migliora selettivamente il funzionamento sociale nei bambini con DSA.

Tabella 5. Riepilogo dei risultati comportamentali.

	Mean (SD)				Group x Time		
	Baseline		End of Treatment		F	p	η_p^2
	Control	Treatment	Control	Treatment			
Autism Diagnostic Observation Schedule,(ADOS-2)							
Total Calibrated SeverityScore	7.13 (0.82)	6.75 (1.62)	7.13 (1.39)	6.75 (1.58)	0.001	0.99	0.000
Social Responsiveness Scale (SRS)							
Total T-Score	84.59 (16.90)	88.50 (17.86)	85.09 (17.14)	80.70 (16.75)	3.78	0.031	0.163
Social Communication	11.75 (3.6)	12.3 (5.1)	13.5 (4.1)	10.3 (3.5)	6.513	0.005	0.325
Social Motivation	5.81 (4.29)	4.71 (3.29)	5.69 (3.30)	3.29 (3.34)	1.962	0.160	0.127
Mental State Understanding	20.88 (7.43)	20.57 (5.80)	22.19 (6.31)	19.86 (4.94)	1.010	0.378	0.070
Repetitive Behavior Scale-Revised (RBS-R)							
Repetitive Behaviors	7.10 (5.17)	7.68 (5.89)	7.10 (5.60)	6.95 (6.51)	1.26	0.294	0.064
Compulsions	2.90 (2.98)	3.06 (3.67)	2.52 (2.87)	3.00 (4.58)	0.128	0.881	0.007
Ritualistic/Sameness	7.14 (6.09)	8.00 (8.16)	6.05 (6.72)	5.63 (8.41)	0.328	0.723	0.017
Restricted Behaviors	2.19 (1.81)	3.26 (2.28)	2.00 (2.26)	2.84 (2.63)	0.296	0.746	0.016
Child Behavior Checklist (CBCL)							
Internalizing Problems	62.33 (8.21)	61.20 (9.88)	60.38 (8.79)	59.00 (8.16)	1.038	0.364	0.052
Externalizing Problems	56.62 (8.75)	59.45 (12.51)	56.48 (9.44)	57.40 (12.98)	2.378	0.106	0.111
Adaptive Behavior Assessment System – 2nd Edition (ABAS-2)							
General Adaptive Composite Score	58.23 (15.44)	58.60 (12.45)	58.95 (17.11)	60.80 (17.69)	1.265	0.293	0.061
Conceptual Adaptive Composite Score	61.00 (12.32)	65.35 (14.40)	61.82 (13.51)	67.95 (17.76)	1.032	0.366	0.050
Social Adaptive Composite Score	65.86 (12.32)	65.60 (12.73)	63.86 (13.50)	69.70 (14.45)	4.45	0.018	0.186
Practical Adaptive Composite Score	58.64 (16.34)	57.70 (13.77)	60.86 (20.69)	58.30 (18.25)	0.279	0.624	0.024
Parenting Stress Index Short Form (PSI/SF)							
Total Score	67.50 (22.27)	68.30 (28.10)	63.50 (29.96)	66.25 (32.40)	0.479	0.623	0.025
Gastrointestinal Symptoms Rating Scale (GSRS)							
Total Score	5.10 (3.39)	6.35 (4.89)	4.14 (3.86)	4.20 (3.00)	0.823	0.447	0.042

Il carattere in grassetto evidenzia i risultati statisticamente significativi.

2.3.3. Effetti del trattamento con *L. reuteri* nell'uomo: valutazione della sicurezza

Nessun evento avverso è stato osservato con l'eccezione di un soggetto nel gruppo attivo, il quale ha manifestato un peggioramento dell'agitazione basale e dell'irritabilità.

Questo sintomi hanno richiesto l'interruzione solo temporanea del trattamento, seguita dalla risoluzione dello stesso.

2.3.4. Effetti del trattamento con *L. reuteri* nell'uomo: profilo del microbioma

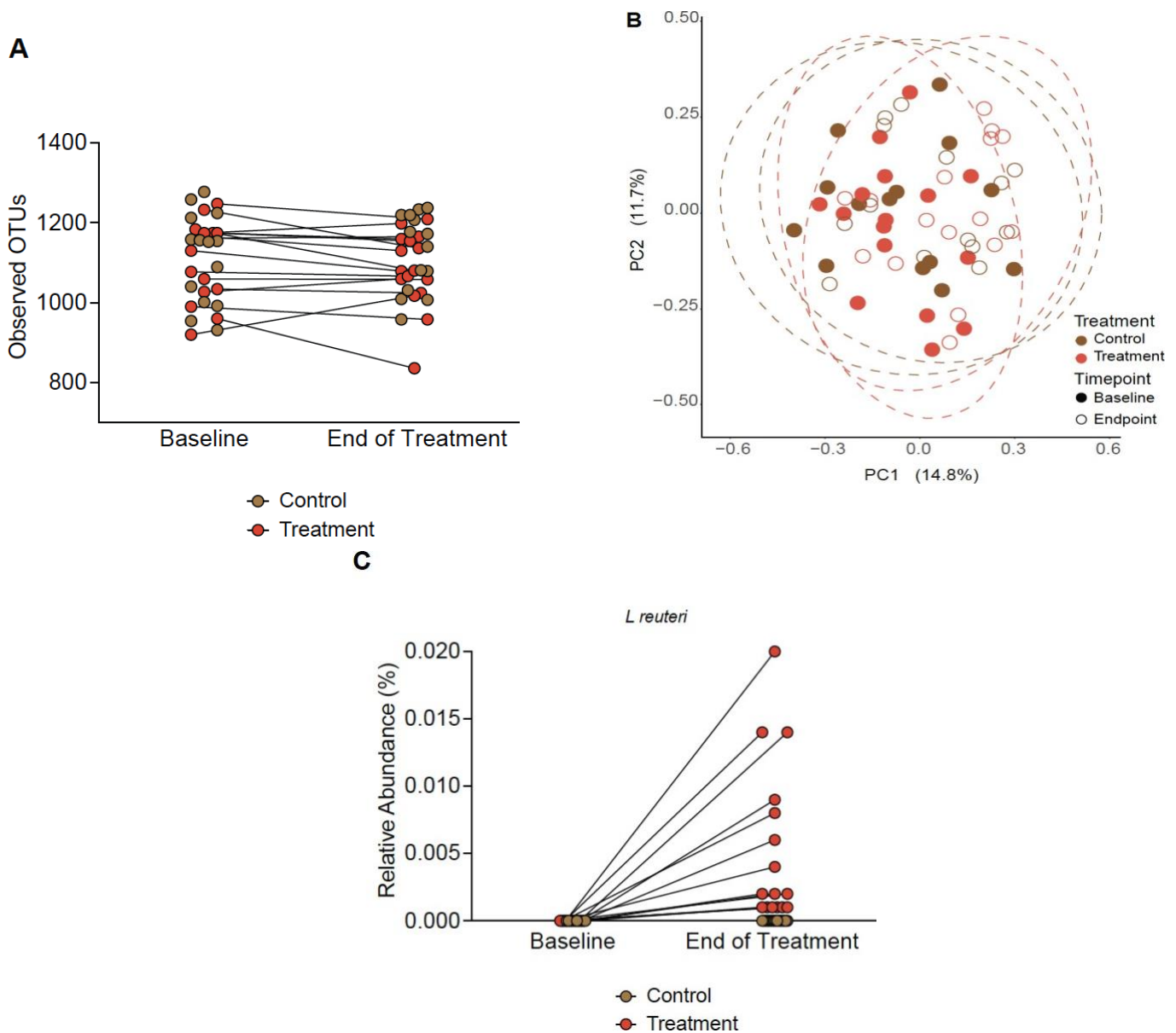
Dato che *L. reuteri* può produrre peptidi antimicrobici [251, 252], è stato valutato se il trattamento con *L. reuteri* modifica il microbioma fecale. A tal fine, sono state eseguite analisi metagenomiche nelle feci dei partecipanti. Per valutare la composizione del microbioma, sono state analizzate diverse metriche per la diversità alfa e beta. Non c'è stato alcun effetto significativo nel tempo per trattamento in diverse metriche per la diversità alfa (ad esempio, OTU osservate, indice di diversità di Shannon e indice Chao1; Figura 3A) o beta-diversità (ad esempio, Brays-Curtis, UniFrac non ponderato; Figura 3B), indicando che *L. reuteri* non ha indotto cambiamenti diffusi nella composizione del microbioma. Inoltre, quando sono state eseguite analisi di taxa, abbiamo identificato solo 4 dei 1424 taxa come differenzialmente abbondanti in funzione del tempo e del trattamento. Come previsto, *L. reuteri* è stato rilevato in tutti gli individui del gruppo di trattamento, ma nessuno del gruppo placebo, alla fine dello studio (Figura 3C). Al contrario, le altre 3 specie differenzialmente abbondanti hanno mostrato cambiamenti che erano incoerenti (dissimili) tra gli individui e si sono verificati sia nel gruppo di controllo che in quello di trattamento. In conclusione, il trattamento con *L. reuteri* non ha alterato considerevolmente la composizione complessiva del microbioma, coerentemente con i risultati preclinici in modelli murini per DSA [229].

Figura 3. Profilo metagenomico dei gruppi trattamento e di controllo

A, Diversità alfa del sequenziamento metagenomico dei gruppi di controllo e trattamento (n = 14-16 per gruppo per timepoint) misurata dal numero di unità tassonomiche operative osservate (OTU osservate; Misure ripetute bidirezionali ANOVA Tempo x trattamento: $F(1, 28) = 2.282, P = 0$).

B, Diversità beta del sequenziamento metagenomico dei gruppi di controllo e di trattamento (n = 14-16 per gruppo per timepoint) misurata mediante analisi delle coordinate principali (PCoA) della dissimilarità di Bray-Curtis (PERMANOVA: $R^2 = 0.00743, P = 0.9911$).

C, Abbondanza relativa dei livelli di *L. reuteri* nel sequenziamento metagenomico dei gruppi di controllo e trattamento (n = 14-16 per gruppo per timepoint)



2.3.5. Effetti di diversi ceppi di *L. reuteri* sul comportamento sociale: modello murino con ASD.

La compressa utilizzata come trattamento in questo studio è un prodotto che contiene due ceppi di *L. reuteri* (vedere metodi, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 e DSM 17938). Tuttavia, non è chiaro se entrambi i ceppi possano migliorare il comportamento sociale o se solo un ceppo stia mediando l'effetto pro-sociale. I precedenti studi preclinici su topi con deficit sociali hanno dimostrato che *L. reuteri* 6475 è sufficiente per migliorare il comportamento sociale [186, 228, 229].

Per determinare se l'effetto prosociale fosse specifico del ceppo, si è prima cercato di determinare se la combinazione di ceppi avrebbe migliorato il comportamento sociale nei topi, come ha fatto nei bambini con DSA. Per rispondere a questa domanda, sono stati trattati topi BTBR (un modello murino con DSA idiopatico), con una combinazione di *L. reuteri* 6475 e *L. reuteri* ATCC PTA 55730, il ceppo genitore di 17938 che è geneticamente e fenotipicamente identico al 17938 a parte due plasmidi [253]. I topi sono stati testati per il comportamento sociale utilizzando i test di socialità e novità sociale a 3 camere (Figura 4A-B), come precedentemente descritto [186, 228, 229]. In breve, nel test di socialità, è stata confrontata la quantità di tempo che il topo sperimentale ha trascorso interagendo con un topo estraneo o una tazza cablata vuota; invece, nel test di novità sociale, abbiamo misurato la quantità di tempo che il topo sperimentale ha trascorso interagendo con un topo familiare o un topo non familiare (Figura 4A). A differenza dei topi sociali C57BL / 6J, i topi BTBR hanno mostrato una compromissione della socialità e della novità sociale, come riflesso dalla mancanza di preferenza per il topo straniero nel test di socialità (Figura 4C) e per il nuovo topo nel test di novità sociale (Figura 4D), in linea con i risultati precedenti [229]. Quattro settimane di trattamento con la combinazione di *L. reuteri* hanno invertito i deficit sociali nei topi BTBR (Figura 4C-D) ma non hanno influenzato l'attività locomotoria o i comportamenti ripetitivi.

Dato che diversi ceppi di *L. reuteri* hanno effetti distinti sui fenotipi dell'ospite, ad esempio, immunomodulazione, metabolismo [252], si è poi cercato di determinare se l'effetto prosociale fosse guidato da entrambi i ceppi o solo da uno dei due ceppi. Il trattamento con *L. reuteri* 6475 migliora il comportamento sociale nei topi BTBR (Figura 4E-F), coerentemente con i precedenti risultati [229]. Sorprendentemente, tuttavia, il trattamento con *L. reuteri* 55730 non riesce a migliorare il comportamento sociale nei topi BTBR (Figura 4E-F). Questi dati suggeriscono che l'effetto prosociale della combinazione di *L. reuteri* nei bambini con DSA è probabilmente mediato dal ceppo *L. reuteri* 6475.

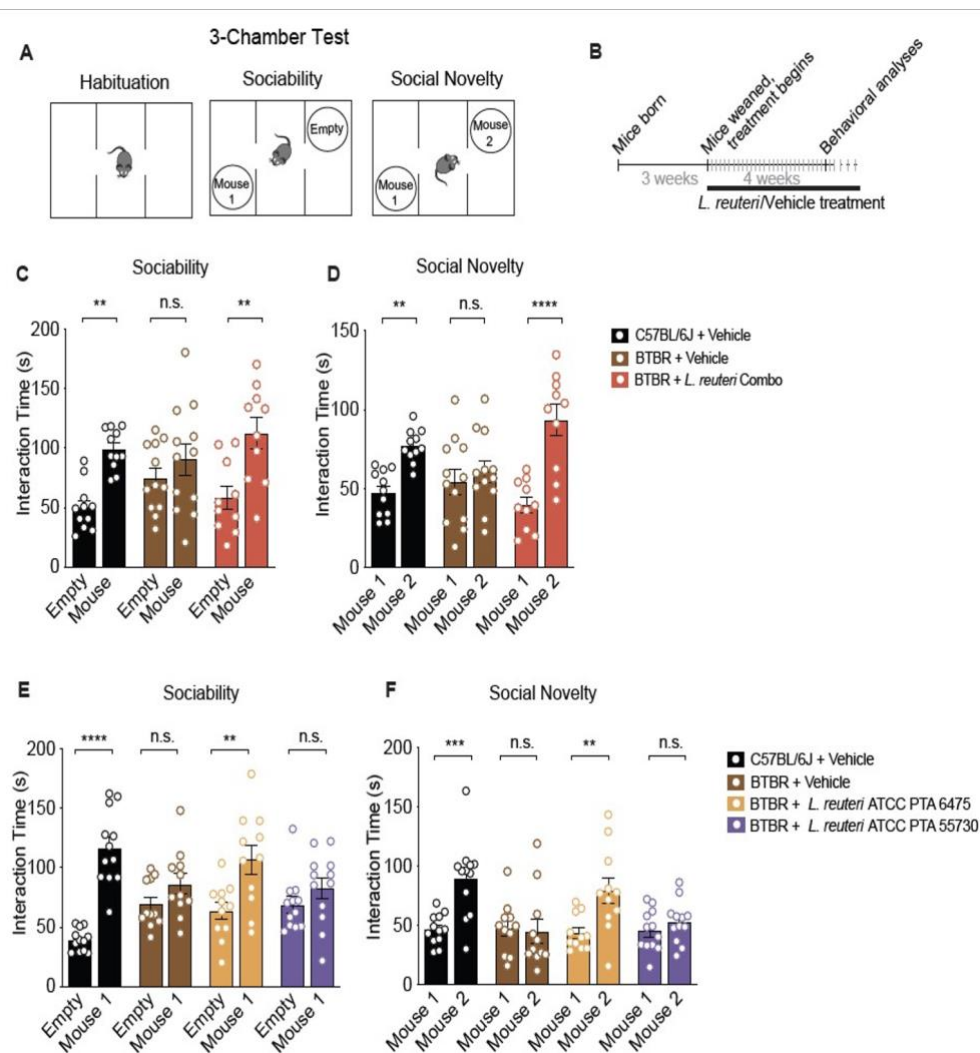
Figura 4. Effetti specifici del ceppo di *L. reuteri* sul comportamento sociale.

A, Schema del test a 3 camere per il comportamento sociale.

B, Schema di disegno sperimentale per il trattamento con *L. reuteri*.

C-D, Comportamento sociale nei topi trattati con *L. reuteri* Combo nel test a 3 camere (n = 10-12 per gruppo; **C**, socievolezza: C57BL/6J + Veicolo: $t = 3.553$, $P = 0.002$, BTBR + Veicolo: $t = 1.214$, $P = 0.6890$, BTBR + *L. reuteri* Combo: $t = 3.758$, $P = 0.0012$, ANOVA bidirezionale con correzione Bonferroni $F(2,60) = 2.340$, $P = 0.1051$; **D**, novità sociale: C57BL/6J + Veicolo: $t = 3.202$, $P = 0.0066$, BTBR + Veicolo: $t = 0.7210$, $P > 0.9999$, BTBR + *L. reuteri* Combo: $t = 5.519$, $P < 0.0001$, ANOVA bidirezionale con correzione Bonferroni $F(2,60) = 6.455$, $P = 0.0029$).

E-F, Comportamento sociale nei topi trattati con *L. reuteri* 6475 o 55730 nel test a 3 camere (n = 11-12 per gruppo; **E**, socievolezza: C57BL/6J + Veicolo: $t = 7.018$, $P < 0.0001$, BTBR + Veicolo: $t = 0.5789$, $P = 0.5789$, BTBR + *L. reuteri* 6475: $t = 3.745$, $P = 0.0013$, BTBR + *L. reuteri* 55730: $t = 1.278$, $P = 0.8188$, ANOVA bidirezionale con correzione Bonferroni $F(3,84) = 6,997$, $P = 0,0003$; **F**, novità sociale: C57BL/6J + Veicolo: $t = 4.272$, $P = 0.0002$, BTBR + Veicolo: $t = 0.2392$, $P > 0.9999$, BTBR + *L. reuteri* 6475: $t = 3.351$, $P = 0.0048$, BTBR + *L. reuteri* 55730: $t = 0.7258$, $P > 0.9999$, ANOVA bidirezionale con correzione Bonferroni $F(3,84) = 4,488$, $P = 0,0057$).



2.4. Discussione

Nel nostro studio clinico in doppio cieco, randomizzato, controllato con placebo, nonostante non siano stati osservati miglioramenti rilevanti nella gravità complessiva dei sintomi dei DSA, è stata presentata la prima evidenza preliminare che il trattamento mirato dell'asse intestino-microbiota-cervello con *L. reuteri* possa avere effetti positivi su uno dei principali sintomi comportamentali dei DSA, ovvero i deficit nelle interazioni sociali. In particolare, il trattamento con *L. reuteri* ha avuto effetti significativi nel ridurre l'intensità dei deficit sociali e nel migliorare le abilità sociali adattive dei bambini. L'asse intestino-microbiota-cervello sta emergendo come un potenziale bersaglio terapeutico innovativo per il trattamento di disturbi neurologici [64, 254]. Sono tuttavia necessarie ulteriori evidenze per dimostrare se le terapie a base microbica migliorino i sintomi principali dei disturbi neurologici. Uno studio preliminare open-label con un farmaco adsorbente orale (AB-2004) che ha affinità per piccole molecole aromatiche o fenoliche riducendo un metabolita microbico ha recentemente mostrato un certo miglioramento nell'ansia e nell'irritabilità nei bambini con DSA, ma non è noto se questo intervento migliori alcuni dei principali sintomi dei DSA (cioè interazione sociale, comunicazione e comportamenti ripetitivi) [255].

Numerose evidenze hanno dimostrato che i bambini con DSA possiedono profili di microbiota intestinale distinti rispetto ai bambini neurotipici [198, 256]. Tuttavia, non è chiaro se i cambiamenti nel microbiota causino i sintomi dei DSA o siano semplicemente correlati alla selettività alimentare tipica di questi bambini [76, 257]. Indipendentemente da ciò, recenti studi clinici hanno dimostrato che la modulazione diretta del microbioma intestinale, tramite trapianto di microbiota fecale, migliora alcuni sintomi comportamentali nei bambini con DSA [258–260]. Sfortunatamente, il trapianto fecale non è ancora standardizzato e presenta diverse problematiche rilevanti, tra cui un aumento del rischio di eventi avversi [261], la necessità di reperire feci da donatore, e la necessità di schermare le feci per i patogeni [262, 263]. Pertanto, si ritiene che l'uso di singoli ceppi microbici, o combinazione di ceppi potrebbe essere un'opzione terapeutica migliore e più sicura.

Nel nostro studio in individui con DSA i miglioramenti indotti da *L. reuteri* erano selettivi per il dominio sociale, coerentemente con i risultati preclinici [186, 228, 229]. È importante sottolineare che il funzionamento sociale è complesso e sfaccettato, comprendendo diversi sottodomini sostenuti da reti neurali almeno parzialmente distinte. Ad esempio, mentre il sottodominio della motivazione sociale è sostenuto da circuiti mesolimbico-corticale-striatale [264, 265], il sottodominio della comprensione dello stato mentale è mediato da circuiti nella corteccia prefrontale mediale dorsale e ventrale, nella giunzione temporo-parietale e nella corteccia/precuneo cingolato posteriore [266]. Pertanto, concentrarsi su specifici sottodomini sociali può essere un approccio più efficace per identificare terapie promettenti, poiché è improbabile che un farmaco agisca su più sistemi neurali.

Di conseguenza, il trattamento con *L. reuteri* ha portato a miglioramenti in aspetti specifici del funzionamento sociale. Negli studi futuri, sarà importante concentrarsi su sottodomini clinici specifici e ben definiti piuttosto che su punteggi compositi di funzionamento globale eccessivamente ampi. Se da una parte il trattamento con *L. reuteri* ha migliorato i componenti del funzionamento sociale, dall'altra esso non ha alterato significativamente la composizione complessiva del microbioma intestinale. Questi risultati sono coerenti con i risultati preclinici nei modelli murini per DSA, i quali hanno mostrato che *L. reuteri* funziona indipendentemente da altri microbi [229] e indipendentemente dalla risposta immunitaria adattativa dell'ospite [232].

2.4.1. Limiti dello studio

Come avviene per altri studi pilota, questi risultati promettenti devono essere valutati considerando alcune limitazioni. Prima di tutto, nonostante l'adozione di un disegno di studio randomizzato e controllato, questo studio risulta fortemente limitato dalla dimensione del campione, in parte a causa delle difficoltà di reclutamento dovute alla pandemia di COVID-19 in Italia. Pertanto, dato il campione ridotto, sarà fondamentale ripetere lo studio con un numero maggiore di partecipanti per confermare questi risultati. Detto questo, un recente articolo di uno studio clinico indipendente con *L. reuteri* eseguito negli Stati Uniti (n = 7-8 per gruppo) mostra anche che *L. reuteri* migliora il funzionamento sociale nei bambini con DSA [267], indicando che l'effetto di *L. reuteri* è riproducibile.

In secondo luogo, sebbene ci sia stato un segnale positivo e specifico per miglioramenti nel funzionamento sociale, l'attuale studio non è stato progettato e non ha la potenza sufficiente per identificare i fattori predittivi di risposta al trattamento. Ad esempio, c'erano pochissime partecipanti di sesso femminile. Gli studi futuri dovrebbero programmare un maggior reclutamento di pazienti di sesso femminile nello studio. È anche importante riconoscere che, sebbene la differenza non fosse statisticamente significativa, il gruppo di trattamento aveva punteggi QI più alti rispetto al gruppo placebo al basale. Data la consolidata eterogeneità nella risposta al trattamento tra gli individui con DSA, sarà fondamentale per studi futuri caratterizzare i profili di responder e non-responder al trattamento con *L. reuteri* in campioni di grandi dimensioni.

In terzo luogo, ADOS-2 è stato scelto come misura di esito primario dato che si tratta di una valutazione osservazionale somministrata dal clinico e quindi potrebbe essere meno incline a distorsioni rispetto alle misure del questionario. Tuttavia, data la ristretta gamma di punteggi nell'ADOS-2 per ciascun elemento, che limita la sua capacità di rilevare sottili cambiamenti [268], non sorprende che ADOS-2 non sia stato modificato dal trattamento con *L. reuteri*. Infatti, numerosi studi hanno scoperto che, sebbene ADOS-2 possa rilevare cambiamenti nella gravità complessiva

dell'ASD nel periodo di diversi anni [269], non è efficace nel catturare i cambiamenti in periodi di tempo più brevi, il che limita la sua utilità come misura dell'esito del trattamento [270].

Infine, al momento non esistono strumenti specificamente progettati per catturare i vari aspetti del funzionamento sociale che siano applicabili a diverse specie (come, ad esempio, i sottodomini del comportamento sociale nei topi e negli esseri umani). Perciò, sarà fondamentale continuare a sviluppare tali strumenti e approfondire la comprensione delle continuità e delle discontinuità tra le specie riguardo agli effetti del trattamento.

Nonostante ciò, i risultati preliminari positivi giustificano ulteriori studi di follow-up con coorti più ampie, che si concentrino su vari aspetti del funzionamento sociale come obiettivo primario e utilizzino misure multimodali per esaminare in modo più approfondito l'efficacia del trattamento con *L. reuteri* per il miglioramento delle capacità sociali nei bambini con DSA.

Inoltre, qualora i risultati di questo studio pilota venissero confermati da uno studio clinico su larga scala, l'impatto clinico potrebbe essere significativo, considerando che al momento non esistono trattamenti approvati dalla FDA per il miglioramento del funzionamento sociale. Pertanto, questi risultati offrono anche la speranza che i principali sintomi dei DSA, e potenzialmente anche altri disturbi cerebrali, possano essere trattati attraverso il targeting dell'asse intestino-microbioma-cervello.

3. CONCLUSIONE

I DSA sono malattie complesse tipiche del neurosviluppo, correlate all'età precoce, che influenzano significativamente la qualità della vita non solo dei pazienti, ma anche dei loro caregiver. Sebbene l'eziologia dei DSA rimanga sconosciuta, diversi fattori potrebbero contribuire alla loro insorgenza, tra cui variazioni genetiche e influenze ambientali, specialmente durante il periodo pre- e perinatale. Negli ultimi anni, l'interesse per il ruolo del tratto GI, che non sarebbe solo un "osservatore passivo", ma potrebbe essere coinvolto nella patogenesi di queste condizioni, è cresciuto notevolmente. L'ipotesi del "leaky gut" suggerisce che difetti nella permeabilità della barriera epiteliale intestinale possano causare segnali inappropriati, derivanti da batteri, tossine ambientali e anche macromolecole. Nonostante questa teoria sia ampiamente supportata, soprattutto dai genitori che ricercano diete speciali e integratori alimentari per i loro figli con DSA, i dati che dimostrano un deficit di permeabilità intestinale sono limitati, e in alcuni studi si evidenzia che la permeabilità possa essere preservata [271]. Pertanto, è necessario approfondire ulteriormente questo aspetto, focalizzando l'attenzione anche sui fattori di rischio perinatali, al fine di comprendere meglio le dinamiche patologiche sottostanti ai DSA.

In sintesi, è evidente che la comunità scientifica stia intensificando gli sforzi per individuare trattamenti efficaci per i DSA, ispirata dai risultati promettenti ottenuti con l'uso di probiotici nei modelli animali. A tal proposito, l'introduzione della metabolomica ha fornito un significativo contributo. Sulla base dei dati ottenuti, sono state esplorate diverse strategie terapeutiche, in particolare l'uso di probiotici, per migliorare i sintomi dei DSA modulando il microbiota. Tuttavia, l'eterogeneità degli studi rende difficile ottenere prove concrete, anche se i risultati preliminari sembrano incoraggianti. Al momento, la definizione di una strategia terapeutica valida rimane un obiettivo ambizioso, che richiede ulteriori ricerche per colmare le lacune esistenti. Inoltre, è importante sottolineare che sia il meccanismo che collega il microbioma intestinale alla sintomatologia dei DSA, sia l'eziologia di questi disturbi, sono ancora parzialmente sconosciuti. Ad oggi, un approccio olistico, supportato da un team multidisciplinare, sembra rappresentare la soluzione più promettente per la gestione dei pazienti con DSA nella pratica clinica.

4. BIBLIOGRAFIA

1. American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Diagnostic Stat Man Ment Disord.
<https://doi.org/10.1176/APPI.BOOKS.9780890425596>
2. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, et al (2018) Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ* 67:1–23.
<https://doi.org/10.15585/MMWR.SS6706A1>
3. Maenner MJ, Shaw KA, Bakian A V., et al (2021) Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. *MMWR Surveill Summ* 70:1–16. <https://doi.org/10.15585/MMWR.SS7011A1>
4. Prosperi M, Turi M, Guerrera S, et al (2021) Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: An Investigation on Core Symptoms and Psychiatric Comorbidity in Preschoolers. *Front Integr Neurosci* 14:. <https://doi.org/10.3389/FNINT.2020.594082>
5. Loomes R, Hull L, Mandy WPL (2017) What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 56:466–474. <https://doi.org/10.1016/J.JAAC.2017.03.013>
6. Bettelheim B (1976) La fortezza vuota: Autismo infantile e nascita del sé. Garzanti
7. Rimland B (1972) Comment on Ward's "Early infantile autism." *Psychol Bull* 77:52–53.
<https://doi.org/10.1037/h0032119>
8. McEvedy C (1965) Infantile autism. The syndrome and its implications for a neural theory of behaviour. *J Psychosom Res* 9:319. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(65\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0022-3999(65)90063-2)
9. Abrahams BS, Geschwind DH (2008) Advances in autism genetics: On the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet.* 9:341–355
10. Piven J, Palmer P, Jacobi D, et al (1997) Broader autism phenotype: Evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. *Am J Psychiatry* 154:185–190.
<https://doi.org/10.1176/ajp.154.2.185>
11. Ozonoff S, Young GS, Carter A, et al (2011) Recurrence risk for autism spectrum disorders: A baby siblings research consortium study. *Pediatrics* 128:.
<https://doi.org/10.1542/peds.2010-2825>

12. Persico AM, Napolioni V (2013) Autism genetics. *Behav. Brain Res.* 251:95–112
13. Trobiani L, Meringolo M, Diamanti T, et al (2020) The neuroligins and the synaptic pathway in Autism Spectrum Disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 119:37–51
14. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, et al (2011) Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry* 68:1095–1102. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76>
15. Zhang TY, Meaney MJ (2010) Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu Rev Psychol* 61:439–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.60.110707.163625>
16. Brown AS (2012) Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev Neurobiol* 72:1272–1276. <https://doi.org/10.1002/dneu.22024>
17. DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, et al (2006) The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. *J. Neurosci.* 26:6897–6906
18. Stoner R, Chow ML, Boyle MP, et al (2014) Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism. *N Engl J Med* 370:1209–1219. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1307491>
19. Courchesne E, Pierce K (2005) Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: Local over-connectivity but long-distance disconnection. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15:225–230
20. Palmieri L, Papaleo V, Porcelli V, et al (2010) Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: Evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1. *Mol Psychiatry* 15:38–52. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.63>
21. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, et al (2006) Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 141:947–956. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30366>
22. Lam KSL, Aman MG, Arnold LE (2006) Neurochemical correlates of autistic disorder: A review of the literature. *Res Dev Disabil* 27:254–289. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2005.03.003>
23. Goodwin MS, Goodwin TC, Cowen MA (1971) Malabsorption and cerebral dysfunction: A multivariate and comparative study of autistic children. *J Autism Child Schizophr* 1:48–62. <https://doi.org/10.1007/BF01537742>
24. Vinood B. Patel VRP (2014) *Comprehensive Guide to Autism*. Springer New York
25. Black C, Kaye JA, Jick H (2002) Relation of childhood gastrointestinal disorders to autism:

- Nested case-control study using data from the UK General Practice Research Database. *Br Med J* 325:419–421. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7361.419>
26. Valicenti-McDermott M, McVicar K, Rapin I, et al (2006) Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. *J Dev Behav Pediatr* 27:. <https://doi.org/10.1097/00004703-200604002-00011>
 27. McElhanon BO, McCracken C, Karpen S, Sharp WG (2014) Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A meta-analysis. *Pediatrics* 133:872–883. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3995>
 28. Jolanta Wasilewska J, Klukowski M (2015) Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks – a possible new overlap syndrome. *Pediatr Heal Med Ther* 6:153. <https://doi.org/10.2147/phmt.s85717>
 29. Galiatsatos P, Gologan A, Lamoureux E (2009) Autistic enterocolitis: Fact or fiction? *Can J Gastroenterol* 23:95–98. <https://doi.org/10.1155/2009/394317>
 30. Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK (2021) The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat. Rev. Microbiol.* 19:241–255
 31. Chaidez V, Hansen RL, Hertz-Picciotto I (2014) Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *J Autism Dev Disord* 44:1117–1127. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-1973-x>
 32. Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA (2018) The Brain-Gut-Microbiome Axis. *CMGH* 6:133–148
 33. Sharma M, Prakash J, Yadav P, et al (2021) Gut-brain axis: Synergistic approach. *Ind Psychiatry J* 30:S297–S300. <https://doi.org/10.4103/0972-6748.328835>
 34. Han W, Tellez LA, Perkins MH, et al (2018) A Neural Circuit for Gut-Induced Reward. *Cell* 175:665-678.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.049>
 35. Foster JA, Rinaman L, Cryan JF (2017) Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol. Stress* 7:124–136
 36. Cryan JF, O’riordan KJ, Cowan CSM, et al (2019) The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev* 99:1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
 37. Aziz Q, Thompson DG (1998) Brain-gut axis in health and disease. *Gastroenterology* 114:559–578. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70540-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70540-2)
 38. Farzi A, Fröhlich EE, Holzer P (2018) Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics* 15:5–22
 39. Zhu X, Han Y, Du J, et al (2017) Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system.

40. Molina-Torres G, Rodriguez-Arrastia M, Roman P, et al (2019) Stress and the gut microbiota-brain axis. *Behav. Pharmacol.* 30:187–200
41. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C (2015) The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* 28:203–209
42. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220–230
43. Bravo JA, Forsythe P, Chew M V., et al (2011) Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16050–16055. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1102999108>
44. Prosperi M, Santocchi E, Guiducci L, et al (2022) Interventions on Microbiota: Where Do We Stand on a Gut– Brain Link in Autism? A Systematic Review. *Nutrients* 14
45. Buie T, Fuchs GJ, Furuta GT, et al (2010) Recommendations for evaluation and treatment of common gastrointestinal problems in children with ASDs. *Pediatrics* 125
46. Ezzat O (2017) Quality of Life and Subjective Burden on Family Caregiver of Children with Autism. *Am J Nurs Sci* 6:33. <https://doi.org/10.11648/j.ajns.20170601.15>
47. Leigh JP, Du J (2015) Brief Report: Forecasting the Economic Burden of Autism in 2015 and 2025 in the United States. *J Autism Dev Disord* 45:4135–4139. <https://doi.org/10.1007/s10803-015-2521-7>
48. Park HR, Lee JM, Moon HE, et al (2016) A short review on the current understanding of autism spectrum disorders. *Exp. Neurobiol.* 25:1–13
49. Molloy CA, Manning-Courtney P (2003) Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and autistic spectrum disorders. *Autism* 7:165–171. <https://doi.org/10.1177/1362361303007002004>
50. Fattorusso A, Di Genova L, Dell’isola GB, et al (2019) Autism spectrum disorders and the gut microbiota. *Nutrients* 11
51. Fasano A (2012) Leaky gut and autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 42:71–78. <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8291-x>
52. Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9:799–809. <https://doi.org/10.1038/NRI2653>
53. Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, et al (2010) Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1801:1175–1183.

<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.07.007>

54. Matta SM, Hill-Yardin EL, Crack PJ (2019) The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav Immun* 79:75–90.
<https://doi.org/10.1016/J.BBI.2019.04.037>
55. Ulluwishewa D, Anderson RC, McNabb WC, et al (2011) Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr* 141:769–776.
<https://doi.org/10.3945/JN.110.135657>
56. De Magistris L, Familiari V, Pascotto A, et al (2010) Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51:418–424. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181dcc4a5>
57. D’Eufemia P, Celli M, Finocchiaro R, et al (1996) Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 85:1076–1079.
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb14220.x>
58. Teskey G, Anagnostou E, Mankad D, et al (2021) Intestinal permeability correlates with behavioural severity in very young children with ASD: A preliminary study. *J Neuroimmunol* 357:. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577607>
59. Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF (2014) Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes, Brain Behav* 13:69–86.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12109>
60. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, et al (2012) Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Dig Dis Sci* 57:2096–2102. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2167-7>
61. Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13:701–712
62. Louis P (2012) Does the human gut microbiota contribute to the etiology of autism spectrum disorders? *Dig Dis Sci*
63. Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, et al (2016) Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J. Gastroenterol.* 22:361–368
64. Vuong HE, Hsiao EY (2017) Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biol. Psychiatry* 81:411–423
65. De Theije CGM, Koelink PJ, Korte-Bouws GAH, et al (2014) Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 37:240–247.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.004>
66. de Theije CGM, Wopereis H, Ramadan M, et al (2014) Altered gut microbiota and activity in

a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 37:197–206.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.005>

67. Karuri AR, Dobrowsky E, Tannock IF (1993) Selective cellular acidification and toxicity of weak organic acids in an acidic microenvironment. *Br J Cancer* 68:1080–1087.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1993.485>
68. El-Ansary AK, Bacha AB, Kotb M (2012) Etiology of autistic features: the persisting neurotoxic effects of propionic acid. *J Neuroinflammation* 9:. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-74>
69. Erny D, De Angelis ALH, Jaitin D, et al (2015) Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18:965–977.
<https://doi.org/10.1038/nn.4030>
70. MacFabe DF (2012) Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. *Microb Ecol Heal Dis* 23:.
<https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.19260>
71. Foley KA, MacFabe DF, Kavaliers M, Ossenkopp KP (2015) Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to lipopolysaccharide, and prenatal and postnatal exposure to propionic acid, on acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorders. *Behav Brain Res* 278:244–256.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.032>
72. Foley KA, Ossenkopp KP, Kavaliers M, MacFabe DF (2014) Pre- and neonatal exposure to lipopolysaccharide or the enteric metabolite, propionic acid, alters development and behavior in adolescent rats in a sexually dimorphic manner. *PLoS One* 9:.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087072>
73. MacFabe DF (2015) Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders. *Microb Ecol Heal Dis* 26:.
<https://doi.org/10.3402/mehd.v26.28177>
74. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, et al (2009) Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3698–3703.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>
75. Mellon AF, Deshpande SA, Mathers JC, Bartlett K (2000) Effect of oral antibiotics on intestinal production of propionic acid. *Arch Dis Child* 82:169–172.
<https://doi.org/10.1136/adc.82.2.169>
76. Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, et al (2019) Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell* 177:1600-1618.e17

77. Thomas AM, Segata N (2019) Multiple levels of the unknown in microbiome research. *BMC Biol.* 17
78. Karimi P, Kamali E, Mousavi SM, Karahmadi M (2017) Environmental factors influencing the risk of autism. *J. Res. Med. Sci.* 22
79. Ristori MV, Quagliariello A, Reddel S, et al (2019) Autism, gastrointestinal symptoms and modulation of gut microbiota by nutritional interventions. *Nutrients* 11
80. Montalto M, D’Onofrio F, Gallo A, et al (2009) Intestinal microbiota and its functions. *Dig Liver Dis Suppl* 3:30–34. [https://doi.org/10.1016/S1594-5804\(09\)60016-4](https://doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60016-4)
81. Parracho HMRT, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL (2005) Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol* 54:987–991. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46101-0>
82. Madore C, Leyrolle Q, Lacabanne C, et al (2016) Neuroinflammation in Autism: Plausible Role of Maternal Inflammation, Dietary Omega 3, and Microbiota. *Neural Plast.* 2016
83. Srikantha P, Hasan Mohajeri M (2019) The possible role of the microbiota-gut-brain-axis in autism spectrum disorder. *Int J Mol Sci* 20:. <https://doi.org/10.3390/ijms20092115>
84. Dinan TG, Cryan JF (2017) Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol* 595:489–503. <https://doi.org/10.1113/JP273106>
85. Cryan JF, O’Riordan KJ, Sandhu K, et al (2020) The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol* 19:179–194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30356-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4)
86. Chen Y, Xu J, Chen Y (2021) Regulation of neurotransmitters by the gut microbiota and effects on cognition in neurological disorders. *Nutrients* 13
87. Dinan TG, Stilling RM, Stanton C, Cryan JF (2015) Collective unconscious: How gut microbes shape human behavior. *J. Psychiatr. Res.* 63:1–9
88. Reardon S (2014) Gut-brain link grabs neuroscientists. *Nature* 515:175–176
89. Lyte M (2011) Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *BioEssays* 33:574–581. <https://doi.org/10.1002/bies.201100024>
90. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161:264–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
91. Gershon MD, Tack J (2007) The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132:397–414
92. Agus A, Planchais J, Sokol H (2018) Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism

in Health and Disease. *Cell Host Microbe* 23:716–724

93. Eltokhi A, Santuy A, Merchan-Perez A, Sprengel R (2021) Glutamatergic dysfunction and synaptic ultrastructural alterations in schizophrenia and autism spectrum disorder: Evidence from human and rodent studies. *Int. J. Mol. Sci.* 22:1–26
94. Chen J, Yu S, Fu Y, Li X (2014) Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 8
95. DiCarlo GE, Mabry SJ, Cao X, et al (2021) Autism-Associated Variant in the SLC6A3 Gene Alters the Oral Microbiome and Metabolism in a Murine Model. *Front Psychiatry* 12:. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.655451>
96. De Caro C, Iannone LF, Citraro R, et al (2019) Can we ‘seize’ the gut microbiota to treat epilepsy? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 107:750–764
97. Pascale A, Marchesi N, Govoni S, Barbieri A (2020) Targeting the microbiota in pharmacology of psychiatric disorders. *Pharmacol. Res.* 157
98. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A (2015) Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin. Cell Dev. Biol.* 38:2–6
99. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, et al (2014) The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 6:. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
100. Bolte ER (1998) Autism and *Clostridium tetani*. 51:133–144. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(98\)90107-4](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(98)90107-4)
101. Collado MC, Rautava S, Aakko J, et al (2016) Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 6:. <https://doi.org/10.1038/srep23129>
102. Kennedy KM, Gerlach MJ, Adam T, et al (2021) Fetal meconium does not have a detectable microbiota before birth. *Nat Microbiol* 6:865–873. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00904-0>
103. Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJF (2017) The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr. Obes.* 12:3–17
104. Zmora N, Suez J, Elinav E (2019) You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16:35–56
105. Putignani L, Del Chierico F, Petrucca A, et al (2014) The human gut microbiota: A dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr Res* 76:2–10. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.49>
106. Perez PF, Doré J, Leclerc M, et al (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune

- system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119:. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1649>
107. Round JL, Mazmanian SK (2010) Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:12204–12209. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909122107>
 108. Ma J, Prince AL, Bader D, et al (2014) High-fat maternal diet during pregnancy persistently alters the offspring microbiome in a primate model. *Nat Commun* 5:. <https://doi.org/10.1038/ncomms4889>
 109. Myhre R, Brantsæter AL, Myking S, et al (2011) Intake of probiotic food and risk of spontaneous preterm delivery. *Am J Clin Nutr* 93:151–157. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004085>
 110. Bertelsen RJ, Brantsæter AL, Magnus MC, et al (2014) Probiotic milk consumption in pregnancy and infancy and subsequent childhood allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 133:. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.032>
 111. Deshmukh HS, Liu Y, Menkiti OR, et al (2014) The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med* 20:524–530. <https://doi.org/10.1038/nm.3542>
 112. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, et al (2013) Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155:1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>
 113. Hsiao EY, McBride SW, Chow J, et al (2012) Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12776–12781. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202556109>
 114. Round JL, Mazmanian SK (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9:313–323
 115. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, et al (2012) Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* (80-.). 336:1262–1267
 116. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC (2016) The microbiome in early life: Implications for health outcomes. *Nat. Med.* 22:713–722
 117. Kushak RI, Buie TM, Murray KF, et al (2016) Evaluation of intestinal function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 62:687–691. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001174>
 118. Arora SK, Dewan P, Gupta P (2015) Microbiome: Paediatricians' perspective. *Indian J. Med. Res.* 142:515–524

119. Groer MW, Gregory KE, Louis-Jacques A, et al (2015) The very low birth weight infant microbiome and childhood health. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* 105:252–264. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21115>
120. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, et al (2017) Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome* 5:. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7>
121. Dinan TG, Cryan JF (2015) The impact of gut microbiota on brain and behaviour: Implications for psychiatry. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 18:552–558
122. Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A (2016) Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Ther.* 158:52–62
123. Curran EA, Dalman C, Kearney PM, et al (2015) Association between obstetric mode of delivery and autism spectrum disorder: A population-based sibling design study. *JAMA Psychiatry* 72:935–942. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.0846>
124. Curran EA, Cryan JF, Kenny LC, et al (2016) Obstetrical Mode of Delivery and Childhood Behavior and Psychological Development in a British Cohort. *J Autism Dev Disord* 46:603–614. <https://doi.org/10.1007/s10803-015-2616-1>
125. Knight R, Callewaert C, Marotz C, et al (2017) The Microbiome and Human Biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 18:65–86. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022438>
126. Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, et al (2013) Reduced Incidence of Prevotella and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children. *PLoS One* 8:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068322>
127. Borre YE, Moloney RD, Clarke G, et al (2014) The impact of microbiota on brain and behavior: Mechanisms & therapeutic potential. *Adv Exp Med Biol* 817:373–403. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_17
128. Finegold SM, Molitoris D, Song Y, et al (2002) Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis* 35:S6–S16. <https://doi.org/10.1086/341914>
129. Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, et al (2000) Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol* 15:429–435. <https://doi.org/10.1177/088307380001500701>
130. Rubio CA, Sveander M, Duvander A (1989) A model to evaluate acute and chronic stress in the colonic mucosa of rats. *Dis Colon Rectum* 32:26–29. <https://doi.org/10.1007/BF02554720>

131. Murakami T, Kamada K, Mizushima K, et al (2017) Changes in Intestinal Motility and Gut Microbiota Composition in a Rat Stress Model. *Digestion* 95:55–60.
<https://doi.org/10.1159/000452364>
132. Rubio CA, Sveander M, Munck-Wikland E, et al (1995) Evaluation of the protracted stress in the esophageal mucosa of rats. *In Vivo (Brooklyn)* 9:187–191
133. Spitz J, Hecht G, Taveras M, et al (1994) The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: The role of bacterial adherence. *Gastroenterology* 106:35–41.
[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(94\)94155-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(94)94155-6)
134. Levy D, Ronemus M, Yamrom B, et al (2011) Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron* 70:886–897.
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.05.015>
135. Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, et al (2011) Multiple recurrent de novo copy number variations (CNVs), including duplications of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* 70:863.
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.05.002>
136. Guang S, Pang N, Deng X, et al (2018) Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder. *Front Cell Neurosci* 12:. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00470>
137. Liu S, Da Cunha AP, Rezende RM, et al (2016) The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal microRNA. *Cell Host Microbe* 19:32. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2015.12.005>
138. Poolchanuan P, Unagul P, Thongnest S, et al (2020) An anticonvulsive drug, valproic acid (valproate), has effects on the biosynthesis of fatty acids and polyketides in microorganisms. *Sci Rep* 10:. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-66251-Y>
139. Christensen J, Grnøborg TK, Srøensen MJ, et al (2013) Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA* 309:1696.
<https://doi.org/10.1001/JAMA.2013.2270>
140. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD (2018) Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 361:36–44. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
141. Marco EJ, Hinkley LBN, Hill SS, Nagarajan SS (2011) Sensory processing in autism: A review of neurophysiologic findings. *Pediatr Res* 69:.
<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3182130c54>
142. Chistol LT, Bandini LG, Must A, et al (2018) Sensory Sensitivity and Food Selectivity in Children with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* 48:583–591.
<https://doi.org/10.1007/s10803-017-3340-9>
143. David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the

- human gut microbiome. *Nature* 505:559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
144. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 21:8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
 145. Piras C, Mussap M, Noto A, et al (2022) Alterations of the Intestinal Permeability are Reflected by Changes in the Urine Metabolome of Young Autistic Children: Preliminary Results. *Metabolites* 12:. <https://doi.org/10.3390/METABO12020104>
 146. Ming X, Stein TP, Barnes V, et al (2012) Metabolic perturbation in autism spectrum disorders: A metabolomics study. *J Proteome Res* 11:5856–5862. <https://doi.org/10.1021/pr300910n>
 147. DeCastro M, Nankova BB, Shah P, et al (2005) Short chain fatty acids regulate tyrosine hydroxylase gene expression through a cAMP-dependent signaling pathway. *Mol Brain Res* 142:28–38. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.09.002>
 148. Yu R, Wu Z, Wang S, et al (2020) Isolation, identification and characterization of propionic acid bacteria associated with autistic spectrum disorder. *Microb Pathog* 147:. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104371>
 149. Lussu M, Noto A, Masili A, et al (2017) The urinary 1H-NMR metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings. *Autism Res* 10:1058–1066. <https://doi.org/10.1002/aur.1748>
 150. De Angelis M, Francavilla R, Piccolo M, et al (2015) Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes* 6:207–213. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1035855>
 151. Noto A, Fanos V, Barberini L, et al (2014) The urinary metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings. *J Matern Neonatal Med* 27:46–52. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.954784>
 152. De Theije CGM, Wu J, Da Silva SL, et al (2011) Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol* 668 Suppl 1: <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2011.07.013>
 153. Kraneveld AD, Szklany K, de Theije CGM, Garssen J (2016) Gut-to-Brain Axis in Autism Spectrum Disorders: Central Role for the Microbiome. *Int Rev Neurobiol* 131:263–287. <https://doi.org/10.1016/BS.IRN.2016.09.001>
 154. Dargenio VN, Dargenio C, Castellaneta S, et al (2023) Intestinal Barrier Dysfunction and Microbiota–Gut–Brain Axis: Possible Implications in the Pathogenesis and Treatment of Autism Spectrum Disorder. *Nutrients* 15
 155. Kuwabara H, Yamasue H, Koike S, et al (2013) Altered metabolites in the plasma of autism

- spectrum disorder: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectroscopy study. *PLoS One* 8:e73814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073814>
156. West PR, Amaral DG, Bais P, et al (2014) Metabolomics as a tool for discovery of biomarkers of autism spectrum disorder in the blood plasma of children. *PLoS One* 9:e112445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112445>
157. Wang H, Liang S, Wang M, et al (2016) Potential serum biomarkers from a metabolomics study of autism. *J Psychiatry Neurosci* 41:27–37. <https://doi.org/10.1503/jpn.140009>
158. Anwar A, Abruzzo PM, Pasha S, et al (2018) Advanced glycation endproducts, dityrosine and arginine transporter dysfunction in autism - A source of biomarkers for clinical diagnosis. *Mol Autism* 9:1–16. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0183-3>
159. Barone R, Alaimo S, Messina M, et al (2018) A subset of patients with autism spectrum disorders show a distinctive metabolic profile by dried blood spot analyses. *Front Psychiatry* 9:636. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2018.00636/BIBTEX>
160. Delaye JB, Patin F, Lagrue E, et al (2018) Post hoc analysis of plasma amino acid profiles: towards a specific pattern in autism spectrum disorder and intellectual disability. *Ann Clin Biochem* 55:543–552. <https://doi.org/10.1177/0004563218760351>
161. Grayaa S, Zerbinati C, Messedi M, et al (2018) Plasma oxysterol profiling in children reveals 24-hydroxycholesterol as a potential marker for Autism Spectrum Disorders. *Biochimie* 153:80–85. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.026>
162. Karhson DS, Krasinska KM, Dallaire JA, et al (2018) Plasma anandamide concentrations are lower in children with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 9:1–6. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0203-y>
163. Lv QQ, You C, Zou XB, Deng HZ (2018) Acyl-carnitine, C5DC, and C26 as potential biomarkers for diagnosis of autism spectrum disorder in children. *Psychiatry Res* 267:277–280. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.06.027>
164. Aran A, Eylon M, Harel M, et al (2019) Lower circulating endocannabinoid levels in children with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 10:1–11. <https://doi.org/10.1186/s13229-019-0256-6>
165. Kelly RS, Boulin A, Laranjo N, et al (2019) Metabolomics and communication skills development in children; evidence from the ages and stages questionnaire. *Metabolites* 9:42. <https://doi.org/10.3390/metabo9030042>
166. Orozco JS, Hertz-Picciotto I, Abbeduto L, Slupsky CM (2019) Metabolomics analysis of children with autism, idiopathic-developmental delays, and Down syndrome. *Transl Psychiatry* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0578-3>

167. Rangel-Huerta OD, Gomez-Fernández A, de la Torre-Aguilar MJ, et al (2019) Metabolic profiling in children with autism spectrum disorder with and without mental regression: preliminary results from a cross-sectional case–control study. *Metabolomics* 15:.
<https://doi.org/10.1007/s11306-019-1562-x>
168. Smith AM, King JJ, West PR, et al (2019) Amino acid dysregulation metabolotypes: potential biomarkers for diagnosis and individualized treatment for subtypes of autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry* 85:345–354. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.08.016>
169. Shen L, Zhang H, Lin J, et al (2022) A combined proteomics and metabolomics profiling to investigate the genetic heterogeneity of autistic children. *Mol Neurobiol* 59:3529–3545.
<https://doi.org/10.1007/s12035-022-02801-x>
170. Wang L, Zheng R, Xu Y, et al (2022) Altered metabolic characteristics in plasma of young boys with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 52:4897–4907.
<https://doi.org/10.1007/s10803-021-05364-3>
171. Sivamaruthi BS, Suganthy N, Kesika P, Chaiyasut C (2020) The Role of Microbiome, Dietary Supplements, and Probiotics in Autism Spectrum Disorder. *Int J Environ Res Public Health* 17:. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17082647>
172. McElhanon BO, McCracken C, Karpen S, Sharp WG (2014) Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A meta-analysis. *Pediatrics* 133:872–883.
<https://doi.org/10.1542/peds.2013-3995>
173. Lefter R, Ciobica A, Timofte D, et al (2020) A descriptive review on the prevalence of gastrointestinal disturbances and their multiple associations in autism spectrum disorder. *Med*. 56
174. Tang Q, Jin G, Wang G, et al (2020) Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10
175. Yasuda K, Oh K, Ren B, et al (2015) Biogeography of the intestinal mucosal and lumenal microbiome in the rhesus macaque. *Cell Host Microbe* 17:385–391.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.015>
176. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, et al (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207–214. <https://doi.org/10.1038/NATURE11234>
177. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174–180
178. Barbara G, Stanghellini V, Brandi G, et al (2005) Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. *Am J Gastroenterol* 100:2560–2568.
<https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00230.x>

179. Heijtz RD, Wang S, Anuar F, et al (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3047–3052.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
180. WOSTMANN B, BRUCKNER-KARDOSS E (1959) Development of cecal distention in germ-free baby rats. *Am J Physiol* 197:1345–1346.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1959.197.6.1345>
181. Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, et al (2011) Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* 60:307–317. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.202515>
182. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, et al (2008) The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res* 43:164–174.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.03.009>
183. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, et al (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558:263–275.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2004.063388>
184. Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, et al (2013) The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84:637–643. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304270>
185. Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, et al (2014) Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry* 19:146–148. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.65>
186. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, et al (2016) Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell* 165:1762–1775.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>
187. Settanni CR, Bibbò S, Ianiro G, et al (2021) Gastrointestinal involvement of autism spectrum disorder: focus on gut microbiota. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15:599–622
188. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, et al (2015) Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *138:179–187*
189. Williams BL, Hornig M, Buie T, et al (2011) Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. *PLoS One* 6:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024585>
190. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, et al (2017) New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome* 5:. <https://doi.org/10.1186/S40168-017-0242-1>
191. Gyawali S, Patra BN (2019) Trends in concept and nosology of autism spectrum disorder: A review. *Asian J Psychiatr* 40:92–99. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2019.01.021>
192. Pulikkan J, Maji A, Dhakan DB, et al (2018) Gut Microbial Dysbiosis in Indian Children

- with Autism Spectrum Disorders. *Microb Ecol* 76:1102–1114
193. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, et al (2013) Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. *PLoS One* 8:1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076993>
 194. Finegold SM, Summanen PH, Downes J, et al (2017) Detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in the gut microbiota of autistic children. *Anaerobe* 45:133–137. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.02.008>
 195. Navarro F, Liu Y, Rhoads JM (2016) Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders? *World J Gastroenterol* 22:10093–10102. <https://doi.org/10.3748/WJG.V22.I46.10093>
 196. Xu M, Xu X, Li J, Li F (2019) Association between gut microbiota and autism spectrum disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis
 197. Kovtun AS, Averina O V., Alekseeva MG, Danilenko VN (2020) Antibiotic Resistance Genes in the Gut Microbiota of Children with Autistic Spectrum Disorder as Possible Predictors of the Disease. *Microb Drug Resist* 26:1307–1320. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0325>
 198. Iglesias-vázquez L, Riba GVG, Arija V, Canals J (2020) Composition of gut microbiota in children with autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 12
 199. Ma B, Liang J, Dai M, et al (2019) Altered Gut Microbiota in Chinese Children With Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Infect Microbiol* 9:. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2019.00040>
 200. Coretti L, Paparo L, Riccio MP, et al (2018) Gut Microbiota Features in Young Children With Autism Spectrum Disorders. *Front Microbiol* 9:. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.03146>
 201. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, et al (2010) Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16:444–453. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>
 202. Liu S, Li E, Sun Z, et al (2019) Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Sci Rep* 9:. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-36430-Z>
 203. Gondalia S V., Palombo EA, Knowles SR, et al (2012) Molecular Characterisation of Gastrointestinal Microbiota of Children With Autism (With and Without Gastrointestinal Dysfunction) and Their Neurotypical Siblings. *Autism Res* 5:419–427. <https://doi.org/10.1002/aur.1253>

204. Plaza-Díaz J, Gómez-Fernández A, Chueca N, et al (2019) Autism spectrum disorder (ASD) with and without mental regression is associated with changes in the fecal microbiota. *Nutrients* 11:. <https://doi.org/10.3390/nu11020337>
205. Williams BL, Hornig M, Parekh T, Ian Lipkin W (2012) Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *MBio* 3:1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00261-11>
206. Kushak RI, Winter HS, Buie TM, et al (2017) Analysis of the Duodenal Microbiome in Autistic Individuals: Association with Carbohydrate Digestion. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 64:e110–e116. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001458>
207. Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, et al (2014) Gut microbes and the brain: Paradigm shift in neuroscience. *J Neurosci* 34:15490–15496. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3299-14.2014>
208. Iovene MR, Bombace F, Maresca R, et al (2017) Intestinal Dysbiosis and Yeast Isolation in Stool of Subjects with Autism Spectrum Disorders. *Mycopathologia* 182:349–363. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0068-6>
209. Kantarcioglu AS, Kiraz N, Aydin A (2016) Microbiota-Gut-Brain Axis: Yeast Species Isolated from Stool Samples of Children with Suspected or Diagnosed Autism Spectrum Disorders and In Vitro Susceptibility Against Nystatin and Fluconazole. *Mycopathologia* 181:1–7. <https://doi.org/10.1007/S11046-015-9949-3>
210. Carbonero F, Benefiel AC, Alizadeh-Ghamsari AH, Gaskins HR (2012) Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease. *Front Physiol* 3 NOV: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00448>
211. Ritz NL, Burnett BJ, Setty P, et al (2016) Sulfate-reducing bacteria impairs working memory in mice. *Physiol Behav* 157:281–287. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.01.023>
212. Son JS, Zheng LJ, Rowehl LM, et al (2015) Comparison of fecal microbiota in children with autism spectrum disorders and neurotypical siblings in the simons simplex collection. *PLoS One* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137725>
213. Van De Sande MMH, Van Buul VJ, Brouns FJPH (2014) Autism and nutrition: The role of the gut-brain axis. *Nutr. Res. Rev.* 27:199–214
214. Pulikkan J, Mazumder A, Grace T (2019) Role of the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorders. *Adv Exp Med Biol* 1118:253–269. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05542-4_13
215. Alshammari MK, AlKhulaifi MM, Al Farraj DA, et al (2020) Incidence of *Clostridium perfringens* and its toxin genes in the gut of children with autism spectrum disorder.

- Anaerobe 61: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102114>
216. Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, et al (2021) Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: A door to the body. *Front Immunol* 12:578386. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.578386>
 217. Sanikhani NS, Modarressi MH, Jafari P, et al (2020) The Effect of *Lactobacillus casei* Consumption in Improvement of Obsessive–Compulsive Disorder: an Animal Study. *Probiotics Antimicrob Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09642-x>
 218. Parracho HMRT, Gibson GR, Knott F, et al (2010) A double-blind, placebo-controlled, crossover-designed probiotic feeding study in children diagnosed with autistic spectrum disorders. *Int J Probiotics Prebiotics* 5:69–74
 219. Kałużna-Czaplińska J, Błaszczuk S (2012) The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. *Nutrition* 28:124–126. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.002>
 220. West R, Roberts E, Sichel L, Sichel J (2013) Improvements in gastrointestinal symptoms among children with autism spectrum disorder receiving the Delpro Probiotic and immunomodulator formulation. *J Probiotics Heal* 01:1–6. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000102>
 221. Shaaban SY, El Gendy YG, Mehanna NS, et al (2018) The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutr Neurosci* 21:676–681. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1347746>
 222. Eugene Arnold L, Luna RA, Williams K, et al (2019) Probiotics for Gastrointestinal Symptoms and Quality of Life in Autism: A Placebo-Controlled Pilot Trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 29:659–669. <https://doi.org/10.1089/cap.2018.0156>
 223. Santocchi E, Guiducci L, Prosperi M, et al (2020) Effects of Probiotic Supplementation on Gastrointestinal, Sensory and Core Symptoms in Autism Spectrum Disorders: A Randomized Controlled Trial. *Front Psychiatry* 11:550593. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.550593>
 224. Wang Y, Li N, Yang JJ, et al (2020) Probiotics and fructo-oligosaccharide intervention modulate the microbiota-gut brain axis to improve autism spectrum reducing also the hyper-serotonergic state and the dopamine metabolism disorder. *Pharmacol Res* 157:.. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.104784>
 225. Pärty A, Kalliomäki M, Wacklin P, et al (2015) A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: A randomized trial. *Pediatr Res* 77:823–828. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.51>
 226. Ng QX, Loke W, Venkatanarayanan N, et al (2019) A systematic review of the role of

- prebiotics and probiotics in autism spectrum disorders. *Med*. 55:129
227. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, et al (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
 228. Buffington SA, Dooling SW, Sgritta M, et al (2021) Dissecting the contribution of host genetics and the microbiome in complex behaviors. *Cell* 184:1740-1756.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.009>
 229. Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, et al (2019) Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron* 101:246-259.e6. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.11.018>
 230. Donaldson ZR, Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* (80-.). 322:900–904
 231. Hung LW, Neuner S, Polepalli JS, et al (2017) Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. *Science* 357:1406–1411. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN4994>
 232. Dooling SW, Sgritta M, Wang I-C, et al (2022) The Effect of *Limosilactobacillus reuteri* on Social Behavior Is Independent of the Adaptive Immune System. *mSystems* 7:. <https://doi.org/10.1128/msystems.00358-22>
 233. Tabouy L, Getselter D, Ziv O, et al (2018) Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun* 73:310–319. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.05.015>
 234. Nettleton JE, Klancic T, Schick A, et al (2021) Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Consumption Alter Behavioral Variables and Intestinal Permeability and Microbiota in BTBR Mice. *Microorganisms* 9:. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9091833>
 235. Indrio F, Di Mauro A, Riezzo G, et al (2014) Prophylactic use of a probiotic in the prevention of colic, regurgitation, and functional constipation: a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr* 168:228–233. <https://doi.org/10.1001/JAMAPEDIATRICS.2013.4367>
 236. Elder JH, Kreider CM, Brasher SN, Ansell M (2017) Clinical impact of early diagnosis of autism on the prognosis and parent-child relationships. *Psychol Res Behav Manag* 10:283–292. <https://doi.org/10.2147/PRBM.S117499>
 237. Rianda D, Agustina R, Setiawan EA, Manikam NRM (2019) Effect of probiotic supplementation on cognitive function in children and adolescents: A systematic review of randomised trials. *Benef. Microbes* 10:873–882

238. Michalec D (2011) Leiter International Performance Scale: Revised. In: Encyclopedia of Child Behavior and Development. Springer, Boston, MA, pp 882–882
239. Lord C, Rutter M, DiLavore PC, et al (2012) Autism Diagnostic Observation Schedule. In: SpringerReference
240. Oakland T (2011) Adaptive Behavior Assessment System – Second Edition. In: Encyclopedia of Clinical Neuropsychology. Springer, New York, NY, pp 37–39
241. Lam KSL, Aman MG (2007) The repetitive behavior scale-revised: Independent validation in individuals with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 37:855–866. <https://doi.org/10.1007/s10803-006-0213-z>
242. Constantino JN, Gruber & (2014) Social Responsiveness Scale-Second Edition (SRS-2). *J Psychoeduc Assess* 32:365–369. <https://doi.org/10.1177/0734282913517525>
243. Rutter M, Bailey A, Lord C (2007) The Social Communication Questionnaire (SCQ). *West Psychol Serv*. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1698-3_1651
244. Achenbach TM (2011) Child Behavior Checklist. In: Encyclopedia of Clinical Neuropsychology. Springer, New York, NY, pp 546–552
245. Abidin RR (1995) Parenting stress index: Manual
246. McIntosh DN, Miller LJ, Shyu V (1999) Development and validation of the Short Sensory Profile. In W. Dunn (Ed.), *Sensory profile: User’s manual*. San Antonio Psychol Corp 59–73
247. Anagnostou E, Jones N, Huerta M, et al (2015) Measuring social communication behaviors as a treatment endpoint in individuals with autism spectrum disorder. *Autism* 19:622–636. <https://doi.org/10.1177/1362361314542955>
248. Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G (1988) GSRS-A clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci* 33:129–134. <https://doi.org/10.1007/BF01535722>
249. Uljarević M, Hedley D, Rose-Foley K, et al (2020) Anxiety and Depression from Adolescence to Old Age in Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* 50:3155–3165. <https://doi.org/10.1007/s10803-019-04084-z>
250. Cuthbert BN (2014) The RDoC framework: Facilitating transition from ICD/DSM to dimensional approaches that integrate neuroscience and psychopathology. *World Psychiatry* 13:28–35. <https://doi.org/10.1002/wps.20087>
251. Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, et al (2007) Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol* 7:. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-101>
252. Spinler JK, Taweechoatipatr M, Rognerud CL, et al (2008) Human-derived probiotic

- Lactobacillus reuteri demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 14:166–171. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.02.001>
253. Rosander A, Connolly E, Roos S (2008) Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl Environ Microbiol* 74:6032–6040. <https://doi.org/10.1128/AEM.00991-08>
 254. Cryan JF, O’Riordan KJ, Sandhu K, et al (2020) The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol* 19:179–194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30356-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30356-4)
 255. Stewart Campbell A, Needham BD, Meyer CR, et al (2022) Safety and target engagement of an oral small-molecule sequestrant in adolescents with autism spectrum disorder: an open-label phase 1b/2a trial. *Nat Med* 28:528–534. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01683-9>
 256. Ding HT, Taur Y, Walkup JT (2017) Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *J. Autism Dev. Disord.* 47:480–489
 257. Yap CX, Henders AK, Alvares GA, et al (2021) Autism-related dietary preferences mediate autism-gut microbiome associations. *Cell* 184:5916–5931.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.015>
 258. Kang DW, Adams JB, Coleman DM, et al (2019) Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep* 9:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42183-0>
 259. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, et al (2017) Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome* 5:. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7>
 260. Li N, Chen H, Cheng Y, et al (2021) Fecal Microbiota Transplantation Relieves Gastrointestinal and Autism Symptoms by Improving the Gut Microbiota in an Open-Label Study. *Front Cell Infect Microbiol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.759435>
 261. Marcella C, Cui B, Kelly CR, et al (2021) Systematic review: the global incidence of faecal microbiota transplantation-related adverse events from 2000 to 2020. *Aliment Pharmacol Ther* 53:33–42. <https://doi.org/10.1111/APT.16148>
 262. Davidovics ZH, Michail S, Nicholson MR, et al (2019) Fecal Microbiota Transplantation for Recurrent *Clostridium difficile* Infection and Other Conditions in Children: A Joint Position Paper from the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for . *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 68:130–143. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002205>
 263. Merrick B, Allen L, Masirah M Zain N, et al (2020) Regulation, risk and safety of Faecal

- Microbiota Transplant. *Infect Prev Pract* 2:. <https://doi.org/10.1016/j.infpip.2020.100069>
264. Groppe SE, Gossen A, Rademacher L, et al (2013) Oxytocin influences processing of socially relevant cues in the ventral tegmental area of the human brain. *Biol Psychiatry* 74:172–179. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.12.023>
265. Clements CF, Ozgul A (2018) Indicators of transitions in biological systems. *Ecol. Lett.* 21:905–919
266. Schurz M, Radua J, Aichhorn M, et al (2014) Fractionating theory of mind: A meta-analysis of functional brain imaging studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 42:9–34
267. Schmitt LM, Smith EG, Pedapati E V., et al (2023) Results of a phase Ib study of SB-121, an investigational probiotic formulation, a randomized controlled trial in participants with autism spectrum disorder. *Sci Rep* 13:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30909-0>
268. Pijl MKJ, Buitelaar JK, de Korte MWP, et al (2018) Sustainability of an early detection program for autism spectrum disorder over the course of 8 years. *Autism* 22:1018–1024. <https://doi.org/10.1177/1362361317717977>
269. Estes A, Munson J, Rogers SJ, et al (2015) Long-Term Outcomes of Early Intervention in 6-Year-Old Children With Autism Spectrum Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 54:580–587. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2015.04.005>
270. Dawson G, Rogers S, Munson J, et al (2010) Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: The early start Denver model. *Pediatrics* 125:. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-0958>
271. Rao M, Gershon MD (2016) The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13:517–528. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2016.107>