



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA**  
**“Santa María de los Buenos Aires”**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**Tesis de doctorado**

**Ingesta dietética, estado nutricional, sensibilidad sensorial y  
microbiota intestinal en niños y adolescentes con trastorno del  
espectro autista y neurotípicos**

**Autor**

María Paula Mendive Dubourdieu, MSc.

**Director**

Marcela Guerendiain, PhD.

**Fecha**

Junio, 2024

**Lugar de trabajo**

Unidad Académica Área de Investigación, Escuela de Nutrición,  
Universidad de la República, Uruguay

<sup>1</sup> En esta investigación el uso del masculino genérico obedece a un criterio de economía del lenguaje y procura una lectura más fluida sin ninguna connotación discriminatoria.

*Este trabajo ha sido financiado por:*



**Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)**, Uruguay. Beca de Doctorado modalidad Sándwich, desde 09/2021 a 12/2022 con pasantía en el grupo de investigación Microbiar a cargo de Juan Bustamante, PhD.



**ICEX España.** Programa de Inversiones en I+D. Proyecto presentado junto con Ismael San Mauro Martín, PhD, con el objetivo de conseguir financiación para proyectos de investigación de España y Uruguay.



**Comisión Sectorial de Investigación Científica.** Programa Movilidad e Intercambios Académicos para docentes de la Universidad de la República. Financiación para la asistencia y presentación de póster en el *17th World Congress of Gastroenterology*, en Turquía en el año 2019.

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de una u otra manera a la realización de esta tesis. En primer lugar, agradezco enormemente a mi tutora, la Dra. Marcela Guerendiain por haberme escuchado, orientado, acompañado, enseñado y guiado en todo este largo camino que recorrimos juntas. Sin ella nada de esto hubiera sido posible, ya que sus ideas, sugerencias, experiencias y conocimientos fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

En segundo lugar, a mi familia, amigas y a los que estuvieron presentes de otra forma como mi padre, por su cariño, apoyo incondicional, paciencia y aliento en todo momento. Fueron mi mayor motivación en tiempos difíciles.

También quiero agradecer a los niños y adolescentes, con y sin trastorno del espectro autista, y a sus familias por confiar en mí y participar de forma comprometida en este proyecto.

Finalmente, a los profesionales, compañeros de trabajo y colegas que me apoyaron en este camino; al Dr. Ismael San Mauro, al ICEX (España), así como a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay) por el apoyo financiero brindado que fue necesario para poder llevar a cabo este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                                                                  | 5  |
| ÍNDICE DE TABLAS.....                                                                                                   | 6  |
| LISTADO DE ABREVIATURAS .....                                                                                           | 7  |
| 1. RESUMEN .....                                                                                                        | 10 |
| 2. ABSTRACT.....                                                                                                        | 11 |
| 3. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DEL TRABAJO DE TESIS.....                                                             | 12 |
| 3.1. Artículos científicos.....                                                                                         | 12 |
| 3.1.1. Publicados.....                                                                                                  | 12 |
| 3.1.2. En proceso de publicación.....                                                                                   | 12 |
| 3.2. Resúmenes .....                                                                                                    | 12 |
| 3.2.1. Publicados en revistas científicas y presentados en eventos científicos ....                                     | 12 |
| 3.2.2. Presentados en eventos científicos .....                                                                         | 13 |
| 4. INTRODUCCIÓN GENERAL .....                                                                                           | 15 |
| 4.1. Niñez y adolescencia.....                                                                                          | 15 |
| 4.2. Trastorno del espectro autista .....                                                                               | 16 |
| 4.3. Alimentación y nutrición de los niños y adolescentes con y sin diagnóstico de trastorno del espectro autista ..... | 18 |
| 4.4. Dieta sin gluten y caseína en el trastorno del espectro autista.....                                               | 21 |
| 4.5. Estado nutricional.....                                                                                            | 25 |
| 4.6. Sensibilidad sensorial.....                                                                                        | 27 |
| 4.7. Microbiota intestinal .....                                                                                        | 30 |
| 5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....                                                                                           | 38 |
| 5.1. Objetivo general .....                                                                                             | 38 |
| 5.1.1 Objetivos específicos .....                                                                                       | 38 |
| 5.2. Hipótesis .....                                                                                                    | 38 |
| 6. ESTUDIO 1 .....                                                                                                      | 39 |
| 6.1. Introducción .....                                                                                                 | 39 |
| 6.2. Material y métodos .....                                                                                           | 40 |
| 6.2.1. Participantes y diseño del estudio .....                                                                         | 40 |
| 6.2.2. Mediciones antropométricas.....                                                                                  | 41 |
| 6.2.3. Ingesta dietética .....                                                                                          | 42 |
| 6.2.4. Sensibilidad sensorial.....                                                                                      | 43 |
| 6.2.5. Análisis estadístico.....                                                                                        | 44 |

|                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3. Resultados .....                                                                                         | 45  |
| 6.4. Discusión .....                                                                                          | 55  |
| 6.5. Conclusiones .....                                                                                       | 59  |
| 7. ESTUDIO 2 .....                                                                                            | 61  |
| 7.1. Introducción .....                                                                                       | 61  |
| 7.2. Materiales y métodos .....                                                                               | 63  |
| 7.2.1. Participantes y declaraciones éticas .....                                                             | 63  |
| 7.2.2. Recolección de muestras, secuenciación de la microbiota intestinal y<br>clasificación taxonómica ..... | 66  |
| 7.2.3. Medidas antropométricas e ingesta dietética .....                                                      | 67  |
| 7.2.4. Análisis estadístico .....                                                                             | 68  |
| 7.3. Resultados .....                                                                                         | 69  |
| 7.4. Discusión .....                                                                                          | 86  |
| 7.5. Conclusiones .....                                                                                       | 91  |
| 8. DISCUSIÓN GENERAL .....                                                                                    | 92  |
| 8.1. Caracterización de los participantes según el neurodesarrollo .....                                      | 92  |
| 8.2. Análisis de la ingesta de alimentos: perfil sensorial y microbiota intestinal .....                      | 94  |
| 8.2.1. Cereales .....                                                                                         | 94  |
| 8.2.2. Lácteos .....                                                                                          | 96  |
| 8.2.3. Bebidas vegetales .....                                                                                | 98  |
| 8.2.4. Alimentos fuente de proteínas .....                                                                    | 100 |
| 8.2.5. Alimentos fuente de grasas .....                                                                       | 101 |
| 8.3. Estado nutricional: ingesta dietética y microbiota intestinal .....                                      | 102 |
| 9. REFERENCIAS .....                                                                                          | 106 |
| 10. ANEXOS .....                                                                                              | 133 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Disbiosis de la microbiota intestinal y el impacto en la barrera hematoencefálica en el trastorno del espectro autista.....                                       | 22 |
| Figura 2. Cambios en personas con trastorno del espectro autista por la unión de los péptidos de tipo opioides con su receptor. ....                                        | 23 |
| Figura 3. Interacción entre sensaciones externas e internas.....                                                                                                            | 28 |
| Figura 4. La transmisión sensorial implica la recepción y procesamiento sensorial desde el tronco encefálico hasta la corteza. ....                                         | 29 |
| Figura 5. Vías metabólicas dependientes de las bacterias intestinales y su posible influencia en el trastorno del espectro autista. ....                                    | 33 |
| Figura 6. Eje intestino, microbiota, cerebro. ....                                                                                                                          | 35 |
| Figura 7. Diagrama de flujo de los participantes del estudio. ....                                                                                                          | 65 |
| Figura 8. Mapa de calor de la asociación entre los géneros y las especies de bacterias y la ingesta dietética en niños con trastorno del espectro autista y neurotípicos. . | 76 |
| Figura 9. Mapa de calor de la asociación entre los géneros y las especies de bacterias y la ingesta dietética en niños con desarrollo típico. ....                          | 78 |
| Figura 10. Mapa de calor de la asociación entre los géneros y las especies de bacterias y la ingesta dietética en el grupo con trastorno del espectro autista. ....         | 80 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Características antropométricas e ingesta dietética en niños con trastorno del espectro autista y desarrollo típico.....                                                                                                                                            | 45 |
| Tabla 2. Perfil sensorial en niños con trastorno del espectro autista y con desarrollo típico.....                                                                                                                                                                           | 48 |
| Tabla 3. Comparación de la ingesta dietética según el estado nutricional (normopeso vs. exceso de peso) y los grupos de neurodesarrollo (trastorno del espectro autista vs. desarrollo típico) mediante ANCOVA de dos vías. ....                                             | 49 |
| Tabla 4. Comparación de la ingesta dietética según el perfil sensorial (funcionamiento típico vs. diferencia probable + diferencia definitiva) y los grupos de neurodesarrollo (trastorno del espectro autista vs. desarrollo típico) mediante ANCOVA de dos vías. ....      | 52 |
| Tabla 5. Abundancia relativa de géneros y especies de bacterias intestinales en niños con trastorno del espectro autista y con desarrollo típico.....                                                                                                                        | 70 |
| Tabla 6. Comparación de los géneros y especies de bacterias intestinales entre los grupos de estado nutricional (normopeso vs exceso de peso) y de neurodesarrollo (trastorno del espectro autista vs desarrollo típico) por medio de ANCOVA de dos vías.....                | 72 |
| Tabla 7. Comparación de los géneros y las especies de bacterias intestinales entre los grupos de ingesta dietética (categorizados según el percentil 50) en niños con desarrollo típico y con trastorno del espectro autista sin dieta por medio de ANCOVA de dos vías. .... | 82 |
| Tabla 8. Comparación de los géneros y las especies de bacterias intestinales entre los grupos de ingesta dietética (categorizados según el percentil 50) en niños con trastorno del espectro autista y una dieta libre de gluten y caseína. ....                             | 85 |

## LISTADO DE ABREVIATURAS

|         |                                                                                                                                                             |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADOS    | Escala de Observación para el Diagnóstico del Autismo ( <i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i> )                                                     |
| ACTH    | Hormona adrenocorticotrófica                                                                                                                                |
| AGCC    | Ácidos grasos de cadena corta                                                                                                                               |
| ATEC    | Lista de Verificación de Evaluación del Tratamiento del Autismo ( <i>Autism Treatment Evaluation Checklist</i> )                                            |
| ATP     | Adenosin trifosfato                                                                                                                                         |
| CFCA    | Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos                                                                                                          |
| CRH     | Hormona corticotrófica                                                                                                                                      |
| CSBS    | Escalas de Comunicación y Comportamiento Simbólico ( <i>Communication and Symbolic Behavior Scales</i> )                                                    |
| DHA     | Ácido docosahexaenoico ( <i>Docosahexaenoic acid</i> )                                                                                                      |
| DP + DD | Diferencia probable + diferencia definitiva                                                                                                                 |
| DSGC    | Dieta sin gluten y caseína                                                                                                                                  |
| DSM-V   | Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, Quinta Edición ( <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition</i> ) |
| DT      | Desarrollo típico                                                                                                                                           |
| DE      | Desvío estándar                                                                                                                                             |
| EEC     | Células enteroendócrinas ( <i>Enterochromaffin cells</i> )                                                                                                  |
| EN      | Estado nutricional                                                                                                                                          |
| EPA     | Ácido eicosapentaenoico ( <i>Eicosapentaenoic acid</i> )                                                                                                    |

|                  |                                                                                                                            |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FT               | Funcionamiento típico                                                                                                      |
| EP               | Exceso de peso                                                                                                             |
| FXR              | Receptor farnesoide                                                                                                        |
| GABA             | Ácido gamma-aminobutírico ( <i>Gamma-aminobutyric acid</i> )                                                               |
| GPR41            | Receptores acoplados a proteínas G 41 ( <i>G Protein Coupled Receptor</i> )                                                |
| GPR43            | Receptores acoplados a proteínas G 43 ( <i>G Protein Coupled Receptor</i> )                                                |
| H <sub>2</sub> S | Sulfuro de hidrógeno                                                                                                       |
| IMC              | Índice de masa corporal                                                                                                    |
| IMC/E            | Índice de masa corporal para la edad                                                                                       |
| M-CHAT           | Lista de Verificación Modificada para el Autismo en Niños Pequeños<br>( <i>Modified Checklist for Autism in Toddlers</i> ) |
| ND               | Neurodesarrollo                                                                                                            |
| NP               | Normopeso                                                                                                                  |
| NS               | No significativo                                                                                                           |
| OB               | Obesidad                                                                                                                   |
| OTUs             | Unidades Taxonómicas Operativas ( <i>Operational Taxonomic Unit</i> )                                                      |
| PS               | Perfil sensorial                                                                                                           |
| PSC              | Perfil sensorial corto                                                                                                     |
| SP               | Sobrepeso                                                                                                                  |
| TEA              | Trastorno del espectro autista                                                                                             |
| T/E              | Talla para la edad                                                                                                         |
| TMAO             | Óxido de trimetilamina ( <i>Trimethylamine N-oxide</i> )                                                                   |

|      |                                                                                                   |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TGR5 | Receptor de ácidos biliares acoplado a proteína G ( <i>G protein-coupled bile acid receptor</i> ) |
| UFC  | Unidades formadoras de colonias                                                                   |
| Z    | Puntaje z                                                                                         |

## 1. RESUMEN

**Introducción:** La alimentación, nutrición y microbiota intestinal poseen un rol fundamental sobre la salud humana y distintas condiciones como el trastorno del espectro autista (TEA). Los niños<sup>1</sup> con TEA pueden presentar una dieta restrictiva debido a una sensibilidad sensorial aumentada o por adherencia a una dieta sin gluten y caseína (DSGC). Por lo tanto, el objetivo de esta tesis consistió en analizar la ingesta dietética, el estado nutricional, el perfil sensorial y la microbiota intestinal en niños y adolescentes con y sin TEA.

**Metodología:** Se realizó un estudio descriptivo transversal, en niños/adolescentes de 3 a 12 años (TEA=35, desarrollo típico (DT)=30). Se aplicaron cuestionarios de perfil sensorial y de frecuencia de consumo de alimentos. Los participantes se categorizaron en: a) normopeso y exceso de peso, de acuerdo al índice de masa corporal/edad, b) funcionamiento típico (FT) y diferencia probable + diferencia definitiva (DP + DD), por su perfil sensorial, y c) TEA-dieta y TEA-no dieta, dependiendo de la adherencia a DSGC. Las bacterias intestinales se estudiaron en muestras fecales por secuenciación del gen ARNr 16S.

**Resultados:** Los niños y adolescentes con TEA presentaron una mayor ingesta de bebidas vegetales ( $p=0,001$ ) y cereales libres de gluten ( $p=0,003$ ), y un menor consumo de pescado ( $p<0,001$ ) que aquellos con DT. Los participantes con TEA mostraron mayor sensibilidad sensorial ( $p<0,001$ ) que los que tenían DT. El grupo TEA más sensible (DP + DD) consumió menos lácteos ( $p=0,019$ ), y más cereales ( $p=0,036$ ) y alimentos ricos en proteínas ( $p=0,034$ ) que sus pares con FT. En los niños/adolescentes con autismo se encontró menor abundancia de *Bifidobacterium longum* y mayor de *Clostridium glycolicum* comparados con los de DT. Aquellos que tenían exceso de peso y TEA, presentaban menos *Roseburia*, *Faecalibacterium prausnitzii*, y más *Eubacterium ventriosum* y *Flavonifactor plautii* que el grupo con DT y el mismo estado nutricional. La ingesta de alimentos (lácteos, bebidas vegetales, cereales con y sin gluten, alimentos fuente de proteínas, pescado, alimentos fuente de grasa, y aceite de coco) se relacionó con la microbiota intestinal, independientemente de la edad, el neurodesarrollo (TEA/DT) y la realización de DSGC (dieta/no-dieta).

**Conclusiones:** Esta investigación muestra una asociación entre la ingesta de alimentos, el estado nutricional, la microbiota intestinal, el neurodesarrollo y el perfil sensorial en niños y adolescentes con y sin TEA. Se necesitan más investigaciones para seguir explorando el impacto en la salud. **Palabras clave:** trastorno del espectroautista; ingesta alimentaria; estado nutricional; perfil sensorial; microbiota intestinal; dieta libre de gluten y caseína; selectividad alimentaria; infancia.

<sup>1</sup> En esta investigación el uso del masculino genérico obedece a un criterio de economía del lenguaje y procura una lectura más fluida sin ninguna connotación discriminatoria.

## 2. ABSTRACT

### **Dietary intake, nutrition, and gut microbiota in children and adolescents with autism spectrum disorder and neurotypical.**

**Background:** Nutrition, diet, and gut microbiota play a fundamental role in human health and various conditions such as autism spectrum disorder (ASD). Children with ASD may exhibit a restrictive diet due to increased sensory sensitivity or adherence to a gluten and casein free diet (GCFD). Therefore, the aim of this thesis was to analyse dietary intake, nutritional status, sensory profile, and gut microbiota in children and adolescents with and without ASD.

**Methods:** A descriptive cross-sectional study was conducted in children/adolescents aged 3 to 12 years (ASD=35, typical development (TD) =30). Questionnaires on sensory profile and food consumption frequency were administered. Participants were categorized into: a) normal weight and overweight, according to body mass index/age, b) typical functioning (TF) and probable difference + definitive difference (PD + DD), based on their sensory profile, and c) ASD-diet and ASD-no diet, depending on adherence to GCFD. Intestinal bacteria were studied in fecal samples through 16S rRNA gene sequencing.

**Results:** Children and adolescents with ASD showed a higher intake of plant-based beverages ( $p=0.001$ ) and gluten-free cereals ( $p=0.003$ ), and lower fish consumption ( $p<0.001$ ) than those with TD. The participants with ASD exhibited higher sensory sensitivity ( $p<0.001$ ) compared to those with TD. The more sensitive ASD group (PD + DD) consumed fewer dairy products ( $p=0.019$ ), and more cereals ( $p=0.036$ ) and protein-rich foods ( $p=0.034$ ) than their TF counterparts. Children/adolescents with autism had a lower abundance of *Bifidobacterium longum* and a higher abundance of *Clostridium glycolicum* compared to those with TD. Participants with excess weight and ASD showed lower *Roseburia*, *Faecalibacterium prausnitzii*, and higher *Eubacterium ventriosum* and *Flavonifactor plautii* than the TD group with the same nutritional status. Food intake (dairy, plant-based beverages, gluten-containing and gluten-free cereals, protein-rich foods, fish, fat-rich foods, and coconut oil) was related to intestinal microbiota, independently of age, neurodevelopment (ASD/TD), and adherence to GCFD (diet/no-diet).

**Conclusions:** This research demonstrate an association between food intake, nutritional status, intestinal microbiota, neurodevelopment, and sensory profile in children and adolescents with and without ASD. Further research is needed to continue exploring its impact on health. **Keywords:** autism spectrum disorder; dietary intake; nutritional status; sensory profile; intestinal microbiota; gluten-free and casein-free diet; food selectivity; childhood.

### 3. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DEL TRABAJO DE TESIS

#### 3.1. Artículos científicos

##### 3.1.1. Publicados

- Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M. *Understanding the link between gut microbiota, dietary intake, and nutritional status in children with autism and typical development.* Front Nutr. 2023 Jul 20;10:1202948. doi: 10.3389/fnut.2023.1202948. PMID: 37545578; PMCID: PMC10399235 (Anexo 1).
- Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M. *Dietary Intake, Nutritional Status and Sensory Profile in Children with Autism Spectrum Disorder and Typical Development.* Nutrients. 2022 May 22;14(10):2155. doi: 10.3390/nu14102155. PMID: 35631297; PMCID: PMC9147144 (Anexo 2).

##### 3.1.2. En proceso de publicación

- Charlo M, Suster L, Ibañez C, Leal S, Martínez Corbellini C, San Mauro Martín I, Guerendiain M, Mendive Dubourdieu P. *Diet is related to gut microbiota characteristics but not to nutritional status in a sample of Uruguayan children and adolescents.*
- Mendive Dubourdieu P, Peralta R., Bustamante J, Guerendiain M. *Diversity and bacterial analysis of gut microbiota in children with and without Autism in Uruguay.*
- Rodríguez E, Rodríguez K, Rivas F, Ortiz G, Guerendiain M, Mendive Dubourdieu P. *Nutritional Status and Gastrointestinal Symptoms in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder and Neurotypical Individuals.*

#### 3.2. Resúmenes

##### 3.2.1. Publicados en revistas científicas y presentados en eventos científicos

- Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M. *Dietary intake, body mass index, and gut Bifidobacterium, Lactobacillus, Clostridium and bacterial diversity in children with autism spectrum disorder and typical development.*
  - Póster presentado en: XII Workshop virtual de la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SEMiPyP) y I Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SIAMPyP). 2021; España (virtual) (Anexo 3).

- Resumen publicado en: Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M. *Dietary intake, body mass index, and gut Bifidobacterium, Lactobacillus, Clostridium and bacterial diversity in children with autism spectrum disorder and typical development*. Anales de Microbiota, probióticos y prebióticos, 2021; 2(2):241. ISSN: 2695-5607. Disponible en: <https://semipyp.es/anales-de-microbiota-probioticos-prebioticos/> (Anexo 4).
- Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M, Grompone G, Carzoglio I. *Relationship between nutritional status and intestinal microbiota of school age children with autism spectrum disorder*.
  - Póster presentado en: *World Congress of Gastroenterology Istanbul*; 2019; Turquía (Anexo 5).
  - Resumen publicado en: Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M, Grompone G, Carzoglio I. *Relationship between nutritional status and intestinal microbiota of school age children with autism spectrum disorder*. Turkish Journal of Gastroenterology, 2019; 30(3):170. ISSN: 21485607 Disponible en: <https://www.turkjgastroenterol.org/> (Anexo 6).

### 3.2.2. Presentados en eventos científicos

- Sánchez Y, Iglesias V, Torregiani R, Charlo M, Mendive Dubourdieu P. *Alimentación en niños, niñas y adolescentes con Trastorno del Espectro Autista*. Póster presentado en: V Jornadas Científicas Estudiantiles de la Escuela de Nutrición, Universidad de la República; 2023; Uruguay (Anexo 7).
- Charlo M, Ibañez C, Leal S, Martínez C, Suster L, Guerendiain M, Mendive Dubourdieu P. *Alimentación, estado nutricional y microbiota intestinal en niños/as y adolescentes*. Póster presentado en: IV Jornadas Científicas Estudiantiles de la Escuela de Nutrición, Universidad de la República; 2022; Uruguay (Anexo 8).
- Argüello N, Bentancor Y, Bermudez C, Delgado G, Guerendiain M, Mendive Dubourdieu P. *Ingesta dietética, estado nutricional y ratio bacteroidetes/firmicutes en niños y adolescentes*. Póster presentado en: IV Jornadas Científicas Estudiantiles de la Escuela de Nutrición, Universidad de la República; 2021; Uruguay (Anexo 9).
- Berriel P, Clavijo F, Duro A, Eguren R, Olivera S, Padilla A, Rodríguez F, Lemes F, Mendive Dubourdieu P. *Creencias, conocimientos y fuentes de información utilizadas por los padres sobre la alimentación de sus hijos con Trastorno del*

*Espectro Autista*. Póster presentado en: IV Jornadas Científicas Estudiantiles de la Escuela de Nutrición, Universidad de la República; 2021; Uruguay (Anexo 10).

- Rodríguez E, Rodríguez K, Rivas F, Ortiz G, Guerendiain M, Mendive Dubourdieu P. *Estado nutricional y sintomatología gastrointestinal en niños y adolescentes con trastorno del espectro autista y neurotípicos*. Póster presentado en: III Jornadas Científicas Estudiantiles de la Escuela de Nutrición, Universidad de la República; 2020; Uruguay (Anexo 11).

## 4. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 4.1. Niñez y adolescencia

La niñez y la adolescencia constituyen un periodo del ciclo vital que conlleva cambios biológicos, psicológicos y emocionales producidos entre el nacimiento y el final de la adolescencia (1). Además, implica un crecimiento constante y desarrollo cognitivo con adquisición de habilidades y maduración cerebral que condiciona las estructuras de la memoria y del procesamiento de información (2). El cerebro alcanza aproximadamente el 90% del tamaño del adulto alrededor de los 6 años de vida, pero los subcomponentes de materia gris y blanca continúan experimentando cambios dinámicos hasta la juventud (3). En etapas tempranas de la vida, la corteza prefrontal se consolida y madura de manera continua (4), y el cerebro se caracteriza por presentar una gran neuroplasticidad, lo que significa que las redes neuronales tienen una gran capacidad para reorganizarse en respuesta a diferentes entornos sociales, de aprendizaje y nutricionales (5).

En diversas investigaciones se ha demostrado la importancia de la ingesta de alimentos y el estado nutricional en niños y adolescentes como factores influyentes en la salud de los mismos (6). No obstante, en esta etapa se pueden observar dificultades en cuanto a la alimentación, que muchas veces son consideradas como parte del desarrollo normal (7). Puede presentarse la selectividad alimentaria como factor predisponente a futuros problemas nutricionales, efectos adversos en la capacidad cognitiva y rendimiento escolar, entre otros (8).

En este sentido, se ha comprobado que mantener una adecuada alimentación y estado nutricional, durante los primeros años de la vida, permite alcanzar un óptimo desarrollo físico y mental (9), así como favorecer la prevención de enfermedades no transmisibles (10). Asimismo, en las últimas décadas se ha incrementado el conocimiento sobre el rol de la microbiota intestinal (conjunto de

microorganismos presentes en intestino delgado y colon) en la salud, siendo la ingesta de alimentos un factor decisivo en su modulación (11). Estos microbios están implicados tanto en la maduración como la diferenciación del sistema inmune y se han relacionado con el estado nutricional (12, 13) así como con diversas patologías, entre las que se encuentra el trastorno del espectro autista (14).

#### 4.2. Trastorno del espectro autista

El trastorno del neurodesarrollo denominado “trastorno del espectro autista” (TEA), se caracteriza por la presencia de déficits sociales y de comunicación, intereses fijos y comportamientos repetitivos (15). Su manifestación comienza en etapas tempranas del desarrollo, según se ha descrito en el *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition* (DSM-V) en 2013 (16).

En dicho manual, se incluye al trastorno generalizado del desarrollo y de Asperger dentro del espectro autista, y adicionalmente se indica que el TEA puede estar acompañado de otros trastornos como síndrome de X frágil y déficit de atención con hiperactividad (17). Además del mencionado, existen diversos instrumentos de cribado para realizar el diagnóstico, como la lista de chequeo modificada para autismo en deambuladores (*Modified Checklist for Autism in Toddlers*, M-CHAT) (18), que es una herramienta de pesquisa que pueden completar los padres para evaluar el riesgo de TEA, y las escalas de comunicación y conducta simbólica (*Communication and Symbolic Behavior Scales*, CSBS) (19), que logran identificar niños con dificultades en el neurodesarrollo (pero no es específica para TEA). También, es ampliamente utilizada la observación (directa y semiestructurada) del comportamiento del niño, establecida en el Programa de Observación para el Diagnóstico del Autismo, del inglés: “*Autism Diagnostic Observation Schedule*”, segunda edición (ADOS-2) (20).

La implementación de nuevas herramientas de detección, así como una mayor comprensión del trastorno, ha permitido identificar de forma más temprana y precisa los casos (21). En las últimas dos décadas, la prevalencia mundial de personas con esta condición aumentó notablemente (22, 23). Se estima que 1 de cada 100 niños está diagnosticado con TEA (21) y se ha constatado que es 4 veces más frecuente en niños que en niñas (23, 24). En América Latina, aproximadamente 6 millones de personas viven con autismo (25), pero en Uruguay no existen datos de la prevalencia.

El padecimiento de dicho trastorno, se cree que puede estar condicionado en un 10% a 20% por factores genéticos, por lo tanto, las causas ambientales (uso de drogas en la gestación, químicos ambientales, agentes infecciosos, tipo de dieta, estresores físicos y psicológicos) podrían tener una gran relevancia en el desarrollo del mismo (26-29). La etiología implica una interacción compleja entre estos factores ambientales y la herencia genética, con más de 800 genes y docenas de síndromes genéticos (por ejemplo, Williams y Phelan-McDermid) posiblemente asociados (30). Sin embargo, no se ha identificado un solo gen o un conjunto común de genes que estén presente en la mayoría de los casos (31). Hasta el momento, se ha descrito que muchos tienen niveles elevados de células de la inmunidad innata como monocitos, macrófagos, células dendríticas, citoquinas proinflamatorias periféricas, que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, aumentar la expresión génica inflamatoria y generar neuroinflamación que perturba la homeostasis cerebral (32). Como consecuencia, se ha documentado una activación microglial alterada y una densidad celular modificada en varias regiones del cerebro.

Por otro lado, cabe destacar que en esta afección tan heterogénea existen distintos niveles de severidad y que suele acompañarse de diversas comorbilidades como alteraciones gastrointestinales, nutricionales, del sueño,

disfunción metabólica y mitocondrial, entre otras (33, 34). Por ejemplo, los individuos con autismo, comparados con los que presentan desarrollo típico, muestran índices más altos de depresión (20% vs 7%), ansiedad (11% vs 5%), dificultades para dormir (13% vs 5%) y epilepsia (21% vs 0,8%) (35). Por ello, un estudio realizado en niños y adolescentes indicó que los costos por el cuidado de la salud de las personas con TEA eran entre 4 a 6 veces mayores que en los neurotípicos (36).

En este sentido, numerosos estudios muestran una elevada prevalencia de disfunción gastrointestinal en pacientes con TEA en comparación con su contraparte (37). Se ha descrito una mayor frecuencia de diarrea, constipación, flatulencia y reflujo gastrointestinal en los niños con autismo (38-40). Asimismo, en el estudio de Adams et al. (41) se identificó que cuanto mayor era la severidad del trastorno del espectro autista en la infancia, medido con la escala “*Autism Treatment Evaluation Checklist*” (ATEC), más sintomatología gastrointestinal presentaban (41-43). Estos síntomas digestivos en quienes padecen autismo, también podrían estar generados por hábitos alimenticios particulares y una sensibilidad sensorial que dificulta la ingesta de determinados alimentos, y que repercuten en la afectación de su estado nutricional (44).

#### 4.3. Alimentación y nutrición de los niños y adolescentes con y sin diagnóstico de trastorno del espectro autista

Para garantizar un desarrollo físico y mental óptimo en niños y adolescentes, es fundamental que mantengan consistentemente un patrón de alimentación saludable a lo largo del tiempo (45). Algunos comportamientos alimentarios de la infancia y pubertad persisten hasta la adultez (46). La adolescencia tiene características particulares como el crecimiento biológico e importantes transiciones a nivel psicosocial que pueden afectar la selección de alimentos (47).

Numerosos estudios describen un deterioro de la calidad nutricional de la dieta, a expensas del gran consumo de alimentos industrializados y ultraprocesados que presentan mayor densidad energética, más azúcares simples, grasas trans, ingredientes como aditivos alimentarios (conservantes, colorantes, agentes texturizantes, potenciadores del olor y el sabor) y menos fibra dietética, proteínas y micronutrientes, que los alimentos sin procesar, mínimamente procesados o elaborados de forma casera (48, 49).

Tradicionalmente, en el área de la investigación nutricional se adoptaba un enfoque reduccionista, donde el análisis de la ingesta se centraba en nutrientes aislados sin tener en cuenta los alimentos y los patrones alimentarios (50). Pero hoy en día, se conoce la importancia de estudiar las ingestas de alimentos, ya que componen los patrones alimentarios, son los que contienen los nutrientes y tienen notables implicaciones, especialmente para la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, y cáncer (51).

Asimismo, se ha descrito que las dietas ricas en grasas y azúcares pueden afectar el neurodesarrollo a través de alteraciones en dos sistemas de neurotransmisores: la señalización de recompensa mediada por la dopamina y la neurotransmisión inhibitoria controlada por el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, del inglés *gamma-aminobutyric acid*) (52). En consecuencia, las modificaciones de estos dos sistemas durante la infancia y adolescencia, por dichos patrones alimentarios, podrían conducir a una alimentación desregulada (53). Además, el crecimiento y desarrollo dependen de la ingesta de algunos micronutrientes críticos para cada etapa de la vida; por ejemplo, en un estudio de cohorte realizado en niños y adolescentes de 2 a 17 años, en Iowa, Estados Unidos, se asoció un alto consumo de leche (alimento fuente de calcio), a una mayor estatura en la adultez, en comparación a los que tuvieron un bajo consumo de este alimento (54).

Para los niños y adolescentes con autismo, la incorporación de nuevos alimentos y de hábitos alimenticios, como comer sentados en la mesa compartiendo con la familia o pares (55), resulta más desafiante en comparación con aquellos que no presentan TEA. Además, Hill et al. (56) mencionan que tienden a preferir alimentos con alta densidad calórica y de baja calidad nutricional, y rechazan frutas, vegetales y cereales integrales.

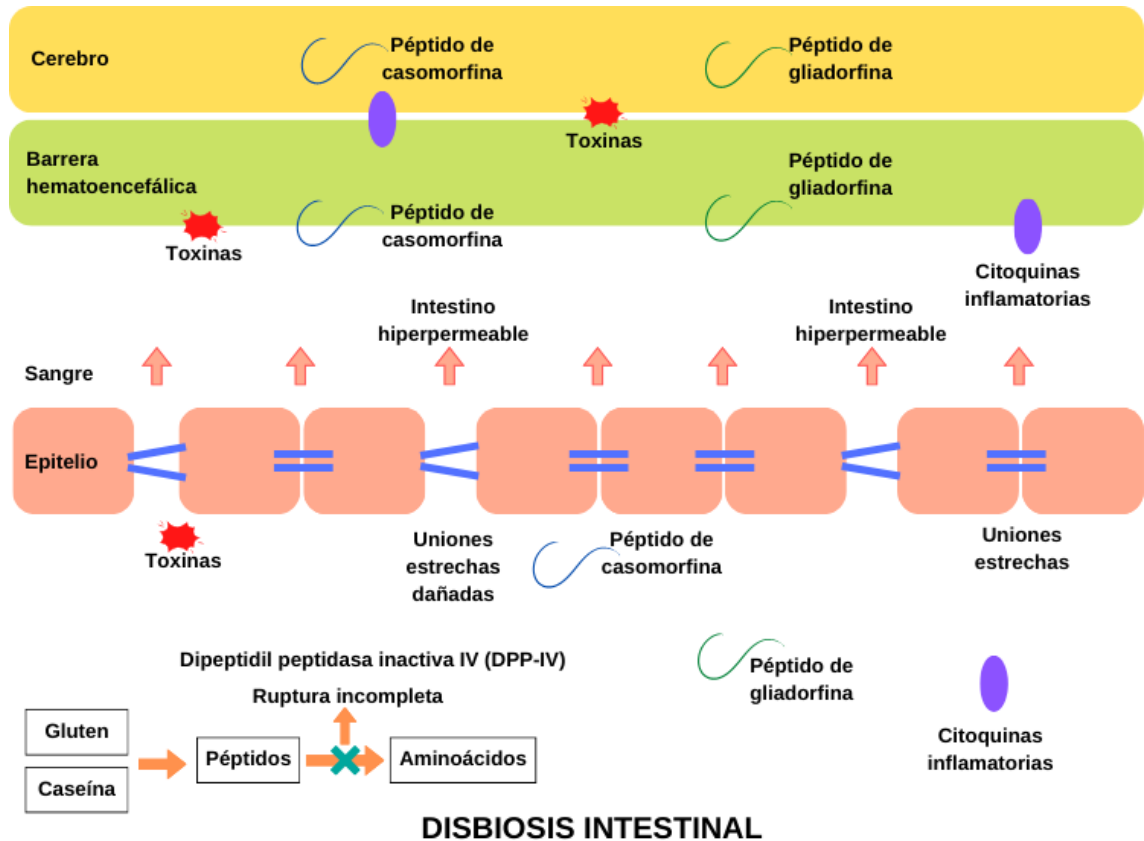
Es importante señalar que según muestra el metaanálisis realizado por Esteban-Figuerola et al. (57), sobre 19 artículos comparativos del consumo de alimentos e ingesta de nutrientes, los niños que presentaban autismo resultaron tener una ingesta significativamente menor de proteínas, calcio, fósforo, selenio, vitamina D, tiamina, riboflavina y vitamina B12, y un consumo mayor de ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E, que los controles sin TEA. Además, indicaban menor consumo de ácidos grasos omega-3, y mayor de frutas y vegetales que los niños neurotípicos. Sin embargo, estos resultados pertenecen a un bajo número de estudios incluidos en el análisis y con metodologías heterogéneas. Cabe destacar que, en relación a las ingestas dietéticas de referencia (DRI), del Instituto de Medicina (del inglés *Institute of Medicine*, IOM), y a las Guías Alimentarias del Departamento de Agricultura de EEUU (del inglés *United States Department of Agriculture*, USDA), los resultados sugieren un posible riesgo de déficit en la ingesta de calcio, vitamina D y lácteos, y una mayor ingesta, de la recomendada, de proteínas, fósforo, selenio, tiamina, riboflavina y vitamina B12 por parte de los que presentaban TEA.

Por otra parte, los familiares consideran que determinadas conductas relacionadas con la alimentación, como dietas cetogénicas, consumo de leche de camello, curcumina, probióticos, alimentos fermentados y dietas libres de gluten y caseína, pueden facilitar la disminución de algunos síntomas del autismo (58). Por el contrario, indican que el consumo de azúcar, aditivos, alimentos genéticamente

modificados, alimentos industrializados, y fibras difíciles de digerir, pueden agravar los síntomas.

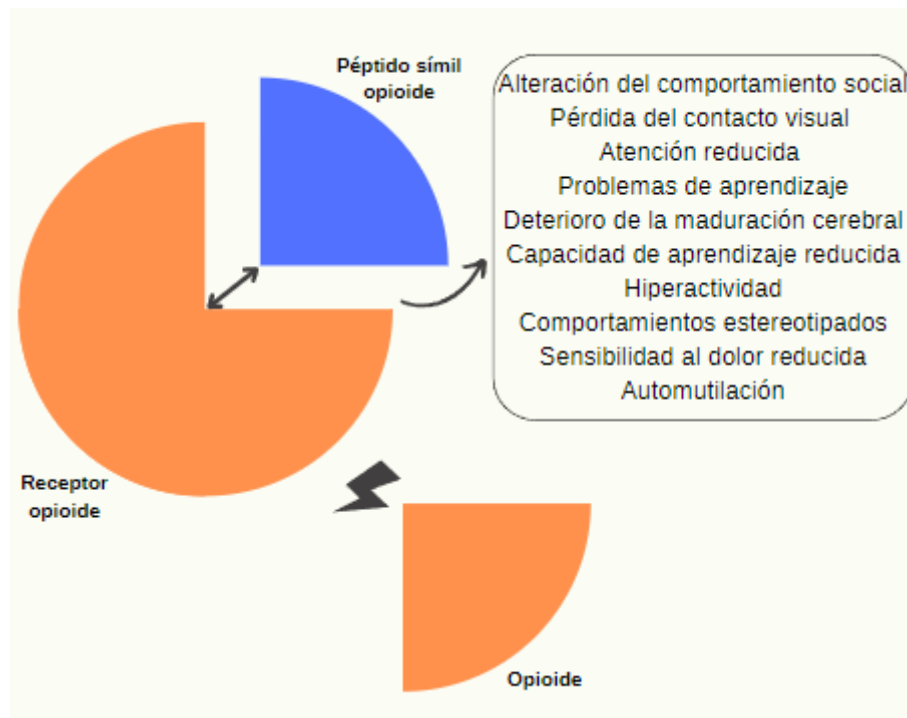
#### 4.4. Dieta sin gluten y caseína en el trastorno del espectro autista

En las personas con TEA se ha descrito una posible perturbación del ecosistema microbiano en el intestino, denominada “disbiosis”, junto con una hiperpermeabilidad intestinal (34, 59) y déficits enzimáticos a nivel digestivo, que se relacionan con una alteración en la digestión del gluten (proteína del trigo, cebada y centeno) y la caseína (proteína presente en los lácteos) (Figura 1) (60). Así, se expone por primera vez en 1980 la hipótesis (no comprobada) de la dieta sin gluten y caseína (DSGC) como posible tratamiento para minimizar las manifestaciones del autismo (60), y reducir los síntomas gastrointestinales (44, 61).



**Figura 1.** Disbiosis de la microbiota intestinal y el impacto en la barrera hematoencefálica en el trastorno del espectro autista. Adaptado de Baspinar B. et al. (60).

El motivo de este abordaje, refiere a que la digestión incompleta de estas proteínas podría generar péptidos opioides (gluteomorfinas, gliadorfinas o caseinomorfina) que logran atravesar la barrera intestinal y luego la hematoencefálica, activando receptores del sistema nervioso central, generando sintomatología relacionada con el autismo (Figura 2) (60, 62). Los sistemas nervioso, inmunológico, endócrino y digestivo poseen distintos receptores opioides, siendo los del cerebro los receptores tipo  $\delta$ ,  $\kappa$  y  $\mu$  (63). La  $\beta$ -casomorfina-7, que proviene de la beta-caseína de la leche de vaca, es un opioide exógeno agonista del receptor  $\mu$ -opioide (MOR) y puede interactuar negativamente con el sistema serotonina-morfina (64, 65). Asimismo, los péptidos opioides derivados del gluten (exorfinas como A4, A5, B4 y B537) podrían interactuar con el receptor opioides  $\delta$  y producir efectos similares (66).



**Figura 2.** Cambios en personas con trastorno del espectro autista por la unión de los péptidos de tipo opioides con su receptor. Adaptado de Baspinar B. et al. (60).

La caseína, es una de las proteínas que más frecuentemente desencadenan una reacción inmunitaria en niños (67); en un estudio retrospectivo, descriptivo, con un tamaño muestral pequeño de niños con autismo, se observó que la mayoría presentaban niveles elevados de anticuerpos de inmunoglobulina G séricos contra la misma (68). Igualmente, en una investigación se observó que la enfermedad celíaca, era tres veces más común en niños con autismo, por lo cual los autores sugieren que se realice un estudio para detectarla en todos los casos de TEA, incluso en aquellos que no presenten síntomas gastrointestinales (69). Ciertamente, la idoneidad fisiológica para realizar la DSGC se puede defender mediante la presencia elevada de anticuerpos o reacciones al gluten o caseína (70).

Algunos estudios sugieren que, si se sigue esta dieta de exclusión, se logra reducir los niveles de péptidos derivados del gluten y la caseína en el organismo, lo cual se ha asociado con una disminución de los mismos en la orina (57). Sin embargo, en otros se indica que no se observan diferencias entre aquellos que, realizan o no la dieta, por

lo que no sería útil como marcador biomédico para el autismo ni para monitorear la respuesta a una DSGC. Un grupo de investigadores, determinó que los niños con TEA que adhieren a este tipo de alimentación, tenían una menor producción de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  que aquellos que no seguían la dieta (71).

En un estudio realizado por Salomone et al. (72), en 18 países europeos (n=1680), se determinó que el 13% de los niños con TEA hacían la dieta. Además, el 47% de los padres informaron haber probado algún tipo de tratamiento de medicina complementaria o alternativa en los últimos 6 meses, y el 25% había experimentado con dietas o suplementos nutricionales. En otra investigación realizada por Winburn et al. (73) mediante una encuesta a 258 padres de niños con TEA, la mayoría (86%) estaban al tanto de la dieta y el 29% la estaban implementando y observaron mejorías significativas en el comportamiento (42% en concentración y atención, 29 % en comunicación, 25% en interacción social, 20% en intereses y comportamientos repetitivos) y otros 22 padres (29%) reportaron "alguna mejora" en los síntomas gastrointestinales. Por otro lado, Knivsberg et al. (74) investigaron los efectos de la DSGC en un grupo reducido de individuos con TEA (10 con dieta y 10 controles), realizando observaciones antes y después de un período de 1 año, y reportaron un desarrollo significativamente mejor en el grupo de niños con dieta que en los controles. De todas maneras existe controversias, no solo de la posible eficacia de la dieta sino también del tiempo estipulado que se debería realizar la intervención (60).

A nivel mundial, se describen estudios de intervención con restricciones dietéticas o suplementación nutricional, sin contar con un conocimiento previo exhaustivo de la alimentación y otras características de las personas con TEA (75). Por ejemplo, existen investigaciones y revisiones sistemáticas que tratan de evaluar el efecto de las dietas libres de gluten y caseína, así como del uso de suplementos (ácidos grasos omega 3, vitaminas) sobre el comportamiento (76). Los mismos muestran, en algunos casos, cambios positivos asociados a mejorías en la comunicación y concentración.

Sin embargo, los resultados no son concluyentes y los estudios existentes tienen varias limitaciones metodológicas en relación a la cantidad de participantes y la calidad científica de los mismos (77). Por esta razón, se considera fundamental caracterizar y conocer en profundidad la alimentación de niños y adolescentes con TEA.

#### 4.5. Estado nutricional

El estado nutricional (EN) se puede definir como el resultado entre la ingesta de nutrientes y las demandas del organismo, siendo de suma importancia su conocimiento en poblaciones vulnerables, tales como niños y adolescentes, así como en grupos que padezcan alteraciones en la salud, ya que el diagnóstico precoz permite intervenir de forma temprana, previniendo complicaciones (78). La malnutrición, tanto por déficit como por exceso, tiene efectos adversos en la calidad de vida (79). No obstante, el comportamiento alimentario es uno de los factores más influyentes y susceptible de ser modificado (80, 81).

La niñez y la adolescencia implican un crecimiento de los tejidos corporales que requiere de una apropiada ingesta de energía y nutrientes presentes en los alimentos (82). Sin embargo, la obesidad infantil es uno de los problemas de salud pública más relevantes a nivel internacional, que ha visto un aumento de la prevalencia de un 4% en 1975 a más del 18% en el año 2016 (82).

La Organización Panamericana de la Salud, en el año 2017, indicó que el número de niños y adolescentes con sobrepeso y obesidad era 10 veces mayor que en las últimas 4 décadas, llegando a 50 millones en el sexo femenino y 74 millones en el sexo masculino, en el mundo (83). En el año 2020, aproximadamente 41 millones de niños menores de 5 años, y 340 millones de individuos entre 5 y 19 años, presentaban sobrepeso u obesidad.

En Uruguay, se llevó a cabo la Encuesta de Nutrición, Desarrollo Infantil y Salud (ENDIS) en primera infancia, en una muestra de hogares con niños menores de 6 años (84). La primera ronda de la investigación comenzó en el año 2013 y la segunda en el 2015. Los resultados de esta última mostraron que un 36% de los niños tenían un peso para la talla mayor al esperado, con un 12% de la población con exceso de peso, y un 0,8% mostró bajo peso para la talla. Además, en el año 2018, la Administración Nacional de Educación Pública (ANEP), llevó a cabo un estudio en escolares de 4 a 12 años y se reportó que un 40% de los niños mayores de 5 años tenían exceso de peso (22% sobrepeso y 17% obesidad) (85).

El sobrepeso y obesidad en la niñez se deben a factores genéticos, metabólicos, culturales, socioeconómicos y ambientales (86). Se han asociado a un consumo elevado de alimentos industrializados ultraprocesados, “comida rápida” y alimentos ricos en azúcares simples, junto a una actividad más sedentaria y a un excesivo uso de equipos electrónicos (83). Consecuentemente, se ha producido un aumento en el riesgo de comorbilidades en la vida adulta, como Diabetes Mellitus tipo 2, dislipemia, hígado graso no alcohólico, hipertensión arterial o enfermedad cardiovascular (86). A su vez, los niños con obesidad pueden ser socialmente estigmatizados y sufrir *bullying*, intimidación o aislamiento social (87).

Por otra parte, se ha comprobado que la desnutrición prolongada resulta en una reducción de la materia gris y blanca del cerebro, especialmente en la red frontoparietal, con efectos en las funciones ejecutivas superiores, que se asocia con una desregulación emocional y procesamiento de señales sociales de forma deficiente (52, 88).

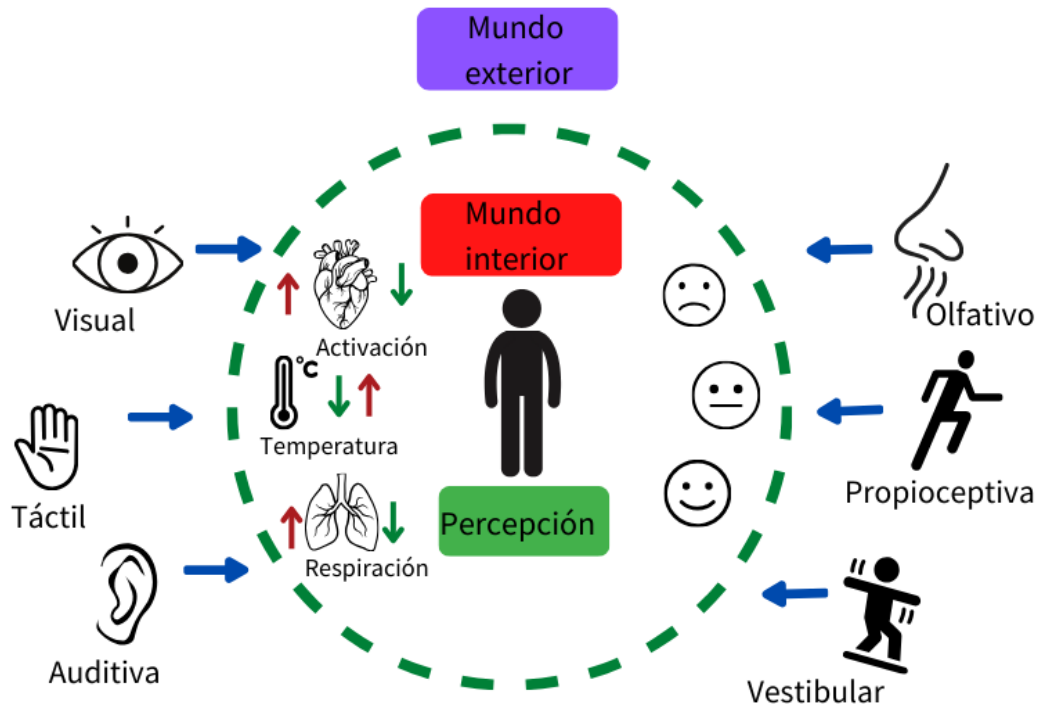
Sumado a eso, algunas investigaciones indican que existe una mayor frecuencia de malnutrición por exceso en niños con autismo en comparación con los no afectados (89). Algunos de los medicamentos utilizados para mejorar la irritabilidad o agresión en dicha condición, como risperidona o aripiprazol, se han asociado con cambios en el

apetito, en el peso y el sueño (35). En esta línea, en la revisión bibliográfica llevada a cabo por Muskens et al. (90), mencionan la importancia de prevenir factores de riesgo comunes en niños y adolescentes con autismo, como la obesidad, el bajo peso, los déficits de vitaminas, el hipo o hipertiroidismo y la dislipemia, ya que contribuiría a mejorar la calidad de vida del paciente y la de su familia.

Cabe destacar que, no se encontraron estudios previos publicados, que analicen el estado nutricional de las personas diagnosticadas con trastorno del espectro autista en Uruguay.

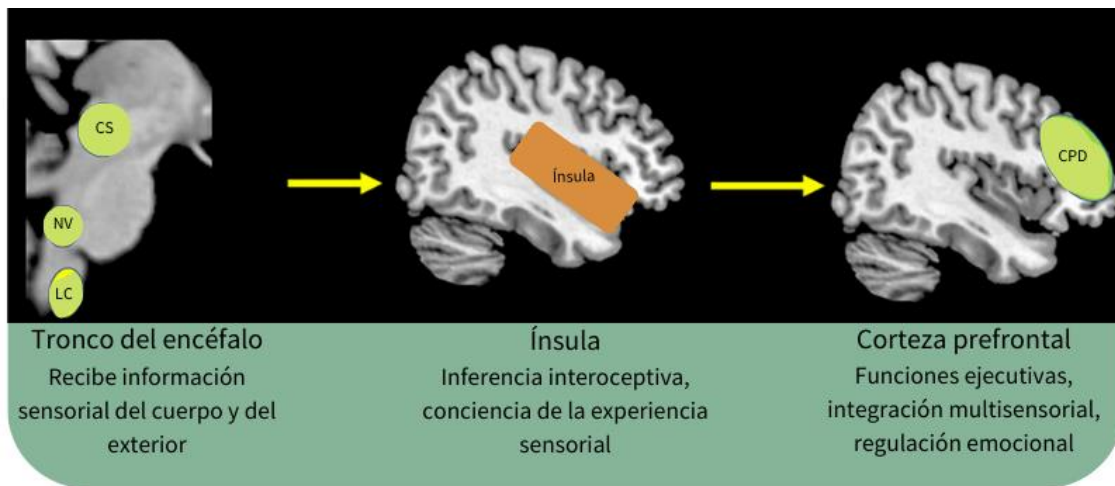
#### 4.6. Sensibilidad sensorial

Las investigaciones realizadas sobre el procesamiento sensorial en sujetos con y sin TEA, han permitido mejorar la comprensión de la respuesta cerebral a los distintos estímulos (90). En 1963 Jean Ayres (91) llevó a cabo el primer estudio sobre los problemas sensoriales en distintos trastornos del desarrollo, e indicó que este procesamiento implica percibir, organizar, e interpretar la información recibida por los sentidos (vista, gusto, tacto, olfato, oído) para generar una respuesta adaptativa (Figura 3) (92). Dicha autora utilizó el término “integración sensorial” para referirse a la habilidad de realizar una respuesta motora y comportamental adecuada al estímulo recibido. Los sistemas límbico, vestibular y propioceptivo son los que están involucrados en la emoción, la motivación, el aprendizaje, la memoria y ciertos aspectos del procesamiento sensorial (Figura 4) (91-93).



**Figura 3.** Interacción entre sensaciones externas e internas. Los seres humanos continuamente reciben información del mundo externo a través de los sentidos y experimentan sensaciones físicas internas como fluctuaciones en la excitación, temperatura y respiración, que pueden desencadenar sensaciones afectivas (por ejemplo miedo o alegría). Integrar las sensaciones externas e internas es fundamental para dar forma a las percepciones sensoriales. Adaptado de Harricharan S. et al (92).

Un número creciente de estudios con neuroimagen, que examinan el procesamiento neural durante la exposición a estímulos sensoriales, han mostrado que las personas con TEA presentan diferencias en la respuesta del sistema límbico ante estímulos visuales, auditivos y táctiles, en comparación con participantes con desarrollo típico (93). Se estima que el 90% de las personas con autismo presentan alteraciones sensoriales (94), siendo frecuente observar hipersensibilidad (respuesta conductual exagerada, como reacción aversiva a luces o determinados sonidos), o hiposensibilidad (falta de respuesta, disminución de la respuesta al dolor), pudiendo coexistir ambas conductas en un mismo sujeto (95, 96).



**Figura 4.** La transmisión sensorial implica la recepción y procesamiento sensorial desde el tronco encefálico hasta la corteza. El tronco encefálico adquiere información sensorial del exterior e interior del cuerpo y luego la transmite a áreas corticales en el cerebro, incluyendo la ínsula y la corteza prefrontal. La ínsula posterior recibe notificaciones sensoriales en bruto (del tronco encefálico), y luego la comunica a la ínsula anterior para crear conciencia de la experiencia sensorial. La corteza prefrontal está principalmente involucrada en la integración multisensorial y la regulación emocional, generando la percepción de una experiencia sensorial. CS: Colículo superior; NV: Núcleos vestibulares; LC: Locus Coeruleus; CPD: Corteza prefrontal dorsolateral. Adaptado de Harricharan S. et al (92).

Ayres (93) observó que los niños con TEA no solo presentan alteraciones en el registro sensorial, sino también en la modulación de las respuestas de las señales que perciben, actuando de manera diferente a aquellos que presentan un desarrollo típico (DT). De esta manera, sugiere que cuanto más afectado esté el sistema límbico, menor será la respuesta del niño con autismo a las terapias que realice. Por otro lado, Corbett et al. (97) encontraron que la sensibilidad sensorial en niños con TEA se relaciona con concentraciones elevadas de cortisol.

En 1999 se desarrolló el cuestionario “Perfil sensorial corto” (*Short Sensory Profile*) para identificar dificultades en el procesamiento sensorial en niños (98). El mismo es un instrumento ampliamente utilizado en cuidadores de niños o adolescentes y consta de treinta y ocho ítems que incluyen siete aspectos de la sensibilidad sensorial (99).

Wang G. et al. (100) realizaron un estudio con niños de China en el cual utilizaron dicho instrumento y observaron una relación entre las alteraciones sensoriales y los disturbios del sueño, problemas del comportamiento y emocionales en los participantes con autismo; y en ambos grupos (TEA y control) las alteraciones del comportamiento alimentario se asociaron a una mayor sensibilidad sensorial.

El perfil sensorial en niños y adolescentes con TEA se refleja en determinados hábitos alimentarios, frecuentemente observados, tales como la selectividad alimentaria y la neofobia, que llevan muchas veces al incumplimiento de las recomendaciones de ingesta de nutrientes y/o energía para la edad, y ocasionan determinados déficits de macro o micronutrientes (por ejemplo: vitaminas D y B12, folato, calcio, hierro, magnesio y selenio) (101, 102). En contrapartida, en una investigación llevada a cabo en el norte de India por Prahbjot Malhi et al. (103), se concluyó que los padres y cuidadores de niños con TEA observan mayores problemas en el comportamiento alimentario (selectividad y rechazo a alimentos) en relación a los neurotípicos, pero no se constató diferencia significativa en la ingesta calórica, la altura, peso e índice de masa corporal.

#### 4.7. Microbiota intestinal

La microbiota intestinal está compuesta por trillones de microorganismos (bacterias, virus, arqueas, parásitos y hongos) residentes en el intestino, que conforman una parte integral de la fisiología humana y que pueden modular la función inmunológica, el metabolismo energético, la salud intestinal y el comportamiento, y cuyo conocimiento ha avanzado mucho en los últimos años (104). Este conjunto de microorganismos se va constituyendo entre los primeros 3 a 5 años de vida, y luego se mantiene más estable y resiliente hasta la vejez, en donde la diversidad nuevamente disminuye (105).

La composición de la microbiota intestinal depende de una multiplicidad de factores como el tipo de parto, la localización geográfica, el uso de antibióticos, el estrés, la edad y, de forma notoria, la ingesta de alimentos (105). Por dicho motivo, cada persona tiene su propio y único conjunto de microbios, aunque se ha visto que se puede coincidir en ciertas características taxonómicas con otros individuos de la misma edad, cultura, alimentación o estado de salud (106).

Múltiples estudios de cohorte han mostrado diferencias entre las bacterias presentes en muestras de materia fecal de controles sanos y las de personas con distintas patologías que cursan con inflamación, como síndrome metabólico, asma, alergia, o enfermedades del neurodesarrollo (107, 108). También, se han reportado divergencias en la composición de la microbiota intestinal de personas con TEA, en comparación con sujetos saludables (109, 110). Algunos estudios muestran mayor concentración del género *Clostridium* en individuos con TEA (111), siendo estas bacterias asociadas a la producción de neurotoxinas que podrían contribuir a la fisiopatología autista (112, 113).

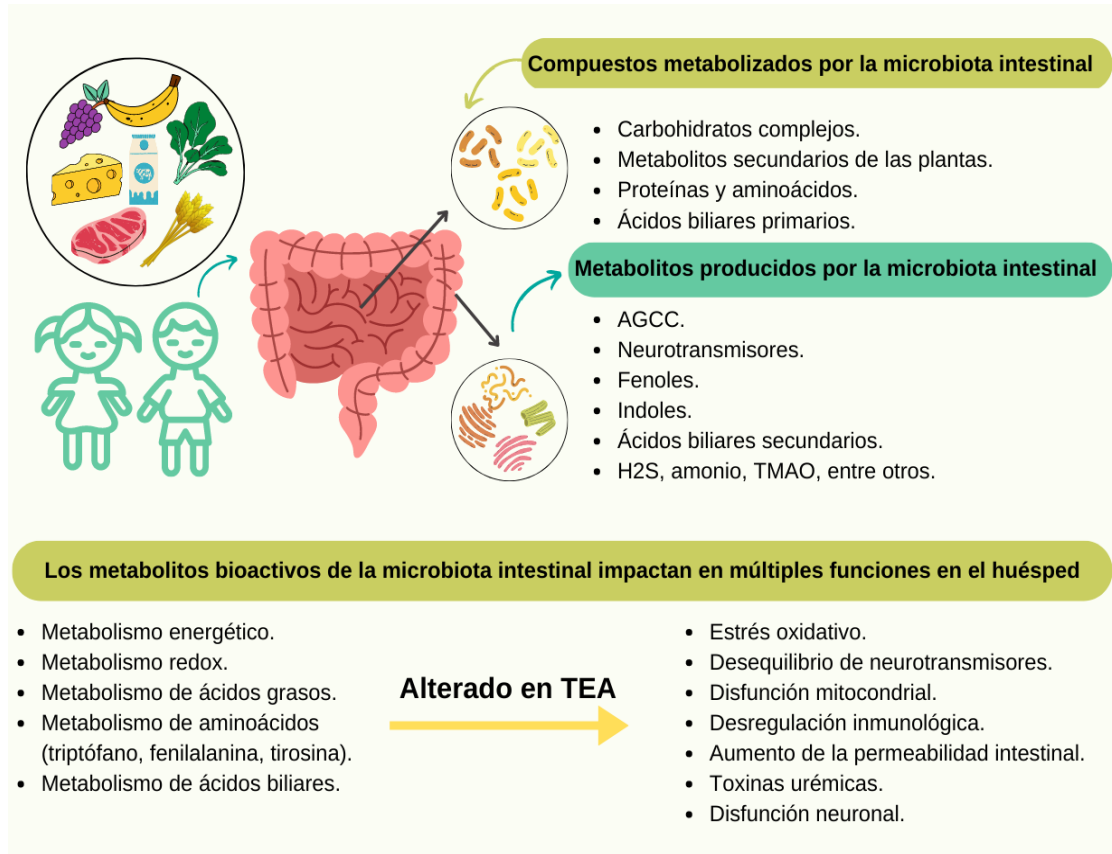
Por otro lado, ciertas bacterias intestinales anaerobias son responsables de metabolizar compuestos provenientes de los alimentos, como los carbohidratos no digeribles, de los cuales se obtienen los ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico, propiónico y acético, entre otros) (114). Estos productos metabólicos tienen efectos beneficiosos en el organismo del huésped por distintas vías, siendo uno de ellos el favorecer el mantenimiento de la capa de mucus intestinal que proporciona propiedades antiinflamatorias (115). Las fibras dietéticas y proteínas digeridas de manera incompleta también sirven como fuente de energía para los microbios y células intestinales (116). Sin embargo, el consumo excesivo de carnes con aporte de colina o carnitina, pueden tener efectos negativos, ya que son utilizados por algunas bacterias como sustratos para formar trimetilamina, que posteriormente es transformada en óxido de trimetilamina (TMAO, del inglés *Trimethylamine N-oxide*) en

el hígado, y al aumentar sus niveles en plasma puede generar un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (105, 117, 118).

La microbiota desempeña un papel importante al ser capaz de regular la integridad de la barrera intestinal, así como la barrera hematoencefálica, ya que ciertos metabolitos se pueden traslocar desde el lumen intestinal hacia el torrente sanguíneo, alcanzando eventualmente el cerebro (119). Asimismo, cabe destacar que, muchas bacterias intestinales son capaces de promover la síntesis de neurotransmisores como el ácido gamma-aminobutírico, que modula respuestas neuronales específicas como la percepción del dolor, la serotonina (5-hidroxitriptamina), implicada en múltiples funciones como la motilidad intestinal, el apetito, el estado de ánimo, la capacidad verbal y la función cognitiva, y otros como la dopamina, norepinefrina, acetilcolina y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que también influyen en los procesos de memoria y aprendizaje (Figura 5) (120).

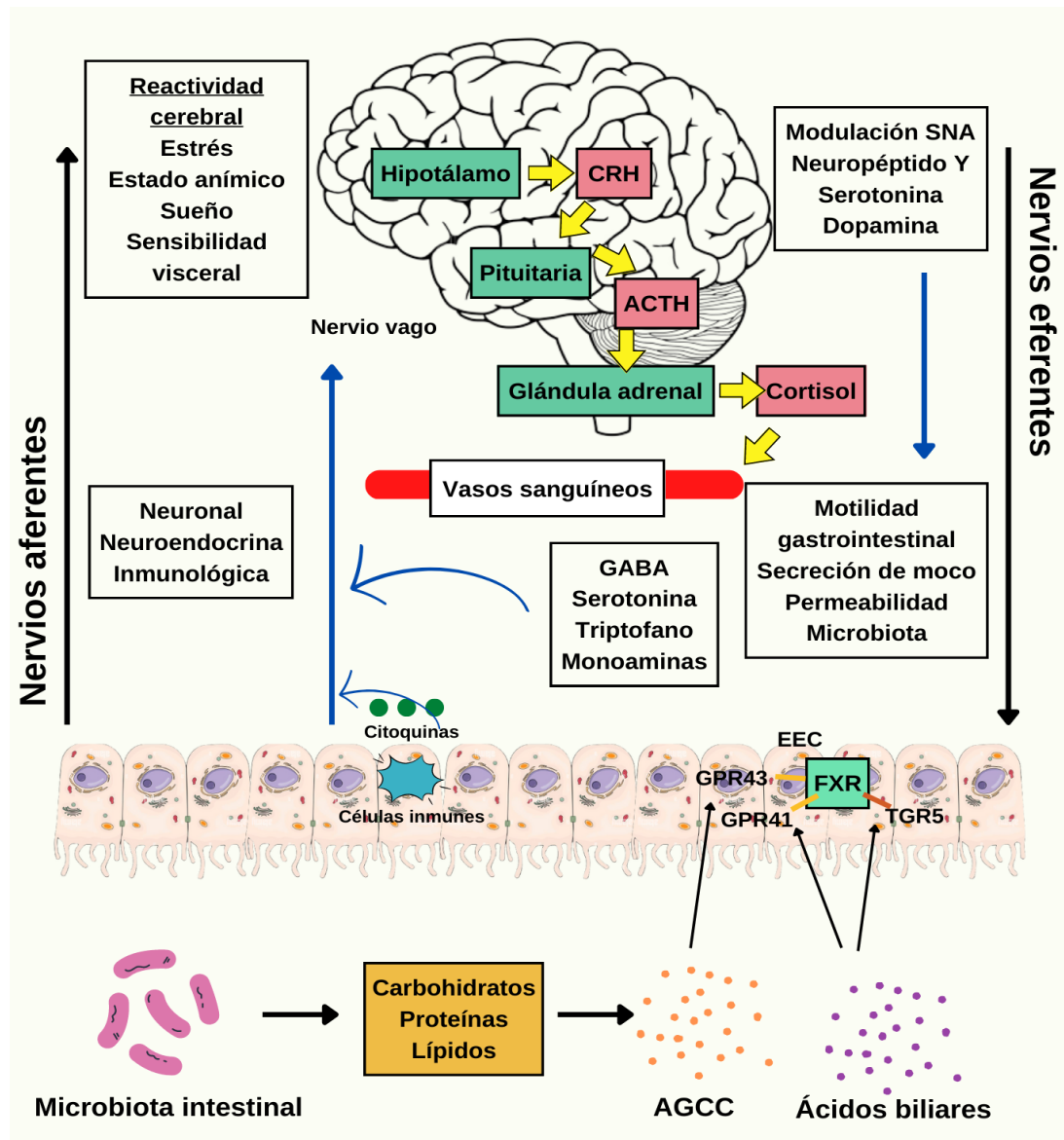
Los microorganismos presentes en el intestino intervienen no solo en la formación de ácidos grasos de cadena corta, sino también en el metabolismo del triptófano, ácidos biliares secundarios y cetonas, que generan señales al interactuar con distintos receptores como el farnesoide y el de ácidos biliares acoplado a proteína G en las células enteroendocrinas (Figura 6) (22). Por ejemplo, las bacterias formadoras de esporas tienen la capacidad de metabolizar triptófano proveniente de la dieta y regular la disponibilidad del mismo. Luego, este aminoácido puede metabolizarse por 3 vías distintas: la de la serotonina/melatonina, que depende de enzimas expresadas en el cerebro e intestino, como triptófano hidrolasa 1 de las células enteroendócrinas y de las células enterocromafines, que liberan 5-hidroxitriptamina; la del metabolismo propiamente de la microbiota intestinal que genera derivados del indol; y la vía de la quinurenina en células inmunes y epiteliales (120, 121). Ésta última, puede generar ácido quinurénico o picolínico con propiedades neuroprotectores, o de lo contrario ácido quinolínico que presenta efectos neurotóxicos (121). En algunos estudios en

niños con TEA se observaron cantidades más bajas de estos metabolitos neuroprotectores y más altas de los tóxicos, al comparar con niños sanos (122). Por otro lado, se ha reportado hiperserotoninemia en personas con autismo, asociada al metabolismo del aminoácido triptófano por parte de las bacterias de la clase Clostridia.



**Figura 5.** Vías metabólicas dependientes de las bacterias intestinales y su posible influencia en el trastorno del espectro autista. La alimentación es un factor que contribuye de manera notoria en la modulación de la composición del ecosistema intestinal. Las bacterias que lo conforman pueden metabolizar compuestos que no fueron absorbidos en el tracto gastrointestinal y dan como resultado metabolitos bioactivos. La disfunción metabólica, producida por una alteración de la composición de los microbios intestinales en los individuos con autismo puede provocar complicaciones, tales como alteración de la función neuronal, aumento del estrés oxidativo, de la permeabilidad intestinal y la barrera hematoencefálica. AGCC: ácidos grasos de cadena corta; H<sub>2</sub>S: sulfuro de hidrógeno; TMAO: óxido de trimetilamina; TEA: Trastorno del espectro autista. Adaptado de Peralta-Marzal L. et al. (120).

Recientemente, se ha descrito al eje denominado intestino-cerebro, que refiere a una vía de comunicación entre el intestino (con la microbiota intestinal) y el cerebro (123). Las bacterias del intestino intervienen en la modulación de procesos importantes en el sistema nervioso central, como la función de células gliales, mielinización, neurogénesis, barrera hematoencefálica, y actividad neuronal, además de intervenir en la maduración del sistema nervioso entérico (124). Un número creciente de investigaciones, en el mundo, apoyan la relación entre alteraciones de la microbiota intestinal (disbiosis), y cambios en el comportamiento emocional por modificaciones bioquímicas en el cerebro (125). Sumado a esto, la disbiosis parece estar relacionada con malnutrición en niños y adolescentes, problemas del comportamiento y síntomas gastrointestinales en personas con TEA (126).



**Figura 6.** Eje intestino, microbiota, cerebro. Vías de señalización bidireccional entre la microbiota intestinal y el cerebro a través de una red psico-neuro-immuno-endócrina, ya sea indirectamente por moléculas producidas en el intestino que actúan sobre terminaciones del nervio vago (aférentes) o directamente por señales que generan los microbios. A su vez, los microorganismos intestinales son regulados por el sistema nervioso autónomo. Las perturbaciones en la comunicación bidireccional pueden estar dadas por estrés psicosocial o derivado del intestino que se manifiesta con trastornos cerebrales-intestinales. Las moléculas transmiten señales que interactúan con el receptor farnesoide (FXR) y el receptor de ácidos biliares acoplado a proteína G (TGR5) y los receptores acoplados a proteínas G 41 (GPR41) y 43 (GPR43) de las células enteroendocrinas (EEC). ACTH: hormona adrenocorticotrófica; CRH: hormona corticotrófica. Adaptado de Sivamaruthi B. et al. (22).

Dado el impacto que la microbiota tiene en la salud, se considera que lograr la modulación de las bacterias intestinales, podría ser una estrategia terapéutica prometedora para las personas con autismo (124, 127). La utilización, por ejemplo, de microorganismos vivos (probióticos), se respalda en ciertos hallazgos en animales, en donde se observa que una normalización del ecosistema intestinal contribuye a mejorar síntomas gastrointestinales y disminuye la severidad de la patología (128, 129). La investigación que desarrolló Costa Mattioli et al. (130), concluyó que la suplementación con *Lactobacillus Reuteri*, en determinados modelos de ratones, puede revertir déficits sociales. A su vez, la administración de especies bacterianas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* ha mostrado implicancia en la reducción de la hiperpermeabilidad intestinal presente en gran parte de las personas con TEA, evitando el pasaje de sustancias potencialmente nocivas, como microorganismos patógenos, lipopolisacáridos derivados de bacterias gram negativas, antígenos o factores proinflamatorios (exorfinas), desde la luz intestinal hacia el medio interno (131-133).

*De acuerdo a la literatura revisada, hasta el momento no existen estudios que describan la alimentación, el estado nutricional, la sensibilidad sensorial y la microbiota intestinal en niños y adolescentes con y sin trastorno del espectro autista, de Uruguay. También se constató la escasez de investigaciones (a nivel mundial), en infancia, niñez y adolescencia, que tengan en cuenta e interrelacionen todas las variables planteadas. Por lo tanto, se consideró sumamente necesario el acercamiento a un mayor conocimiento de la realidad y un análisis profundo de esta población, en relación a estos temas, como un inicio para poder desarrollar asistencia nutricional y dietoterapia adaptadas a sus necesidades, con la finalidad de favorecer una mejor evolución clínica del niño o adolescente.*

*Esta investigación busca contribuir al conocimiento y esclarecimiento de controversias con respecto a la relación de la alimentación, el estado nutricional, la sensibilidad*

*sensorial, la microbiota intestinal y el neurodesarrollo, pudiendo resultar de relevancia para la comunidad científica local e internacional.*

## 5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 5.1. Objetivo general

Avanzar en el conocimiento científico sobre ingesta dietética, estado nutricional, sensibilidad sensorial y microbiota intestinal en niños y adolescentes con trastorno del espectro autista y desarrollo típico, para contribuir a una adecuada dietoterapia y abordaje nutricional.

#### 5.1.1 Objetivos específicos

- Analizar la ingesta dietética y el perfil sensorial de los niños y adolescentes considerando el neurodesarrollo, el tipo de dieta que realizan y el estado nutricional.
- Estudiar la composición bacteriana intestinal y su relación con el estado nutricional, el neurodesarrollo y la ingesta dietética.

### 5.2. Hipótesis

- Los niños y adolescentes con trastorno del espectro autista presentan malnutrición y mayor sensibilidad sensorial, comparados con sus pares con desarrollo típico, que se asocian a una dieta alterada (alimentos libres de gluten y caseína, ricos en grasas y disminuidos en proteínas).
- La disbiosis de la microbiota intestinal se relaciona con malnutrición, el trastorno del espectro autista y una ingesta de alimentos alterada.

## 6. ESTUDIO 1

### INGESTA DIETÉTICA, ESTADO NUTRICIONAL Y PERFIL SENSORIAL EN NIÑOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA Y DESARROLLO TÍPICO

#### 6.1. Introducción

La prevalencia mundial de personas diagnosticadas con trastorno del espectro autista (TEA) está aumentando; en el año 2019 el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) estimó que 1 de cada 59 niños tenían TEA (134, 135). Múltiples factores ambientales, inmunológicos y genéticos juegan un rol en su patogénesis (44), lo que ha aumentado el interés en el efecto de dietas especiales y la nutrición sobre el autismo, principalmente como un posible abordaje para mejorar el comportamiento, la capacidad de atención, la interacción social y el contacto visual (136). Muchos estudios han mostrado que algunos niños y adolescentes con autismo siguen una dieta sin gluten y caseína (37, 137). Graf-Myles et al. (138) reportaron que las restricciones dietéticas pueden impactar en la ingesta de cereales y lácteos, y también llevar a una menor ingesta de calcio y granos suplementados con folato en el grupo con TEA, en comparación al grupo con desarrollo típico.

Además, es frecuente observar patrones dietéticos rígidos y repetitivos en esta población (134). Algunos problemas de procesamiento sensorial, como la modulación sensorial expresada como hiper y/o hiposensibilidad, parecen generar mayores dificultades para adaptarse a nuevos alimentos, lo que tiene un impacto en el desarrollo de los niños (135). Por otro lado, los niños con DT cerca de los seis años, suelen mostrar preferencia por ciertos alimentos y rechazo hacia otros (44, 136). Muchos factores influyentes pueden afectar las elecciones alimentarias individuales;

algunos estudios sugieren que los desórdenes alimentarios en el autismo pueden

<sup>1</sup> En esta investigación el uso del masculino genérico obedece a un criterio de economía del lenguaje y procura una lectura más fluida sin ninguna connotación discriminatoria.

contribuir de forma significativa a las comorbilidades asociadas a síntomas gastrointestinales (37, 135, 137). Además, otros estudios muestran que los niños con TEA tienen mayores tasas de sobrepeso u obesidad que los niños con DT, este hecho podría estar relacionado con los patrones dietéticos y la disminución de oportunidades para realizar actividad física (102). Asimismo, un índice de masa corporal (IMC) de normopeso podría ocultar deficiencias nutricionales. En los niños con TEA, se ha observado un rechazo de la ingesta de determinados grupos de alimentos, como aquellos ricos en proteína, y un mayor consumo de alimentos hipercalóricos ricos en grasas (139).

A pesar de que se conoce que los niños y adolescentes con autismo pueden ser muy selectivos a la hora de elegir alimentos y tienden a escoger texturas, colores, olores u otras características específicas de los mismos, actualmente existen pocos estudios que examinen sus elecciones alimentarias o las comparen con las de los niños con DT (136). Gran parte de la investigación disponible y pública se centra en la ingesta de nutrientes o suplementos, pero no proporciona información sobre la dieta o estado nutricional. Por tanto, nuestro objetivo fue describir y analizar el estado nutricional de los niños y adolescentes con TEA y DT, a través de medidas antropométricas, ingesta dietética y perfil sensorial, utilizando el cuestionario “Perfil Sensorial Corto” (PSC), reportado por los padres (98).

## 6.2. Material y métodos

### 6.2.1. Participantes y diseño del estudio

Se realizó un estudio descriptivo transversal en 65 niños y adolescentes, entre 3 y 12 años de edad, con TEA (n=35) y DT (n=30), reclutados en Montevideo, Uruguay; participantes del proyecto de investigación “Alimentación, nutrición y salud intestinal en niños y adolescentes con trastorno del espectro autista y neurotípicos”. Los participantes fueron invitados a integrar el estudio a través organizaciones de padres

de niños con autismo y en centros de abordajes terapéuticos. El criterio de inclusión para el grupo TEA fue un diagnóstico clínico realizado por un psiquiatra o pediatra especialista en neurología, confirmado por el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales 5° Edición (140). El grupo con DT incluyó niños sin alteraciones del neurodesarrollo. Aquellos diagnosticados con déficit de atención e hiperactividad, diabetes mellitus, enfermedades genéticas, errores congénitos del metabolismo, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad celíaca, discapacidad motora, o sin el consentimiento informado de los padres, fueron excluidos de ambos grupos. Ningún niño del grupo DT tenía restricciones dietéticas.

El estudio cumple con todos los requisitos éticos para estudios en humanos, establecidos en la Declaración de Helsinki (2000) y en la normativa uruguaya. Fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Escuela de Nutrición, Universidad de la República, y registrado en el Ministerio de Salud de Uruguay (N° 282599).

### 6.2.2 Mediciones antropométricas

Las variables antropométricas se obtuvieron durante una entrevista con los niños y sus padres, habiendo previamente firmado un consentimiento informado. Para las mediciones antropométricas de peso y talla, los participantes vestían ropa liviana y estaban descalzos, de acuerdo a las técnicas estandarizadas por Frisancho y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (141, 142). Las mediciones fueron realizadas por el mismo nutricionista investigador, por triplicado, para evitar errores intraobservador, y posteriormente se promediaron. El peso fue medido utilizando una balanza electrónica portátil (Seca 813 Hamburgo, Alemania) con un máximo de capacidad de 200 kg y una precisión de 100 gr. La talla fue tomada con un tallímetro portátil con varilla (Seca 208) con rango de 810 a 2060 mm y una precisión de 1 mm. Las lecturas fueron registradas en metros y centímetros. Los datos de peso al nacer se obtuvieron del carné pediátrico de cada participante.

El estado nutricional se evaluó de acuerdo a los indicadores talla para la edad (T/E) e índice de masa corporal para la edad (IMC/E), expresados en puntaje z (Z). Se utilizaron los programas Anthro (para niños entre 3 a 5 años) y Anthro Plus (para niños entre 5 a 12 años) (OMS v.1.0.2, 2007), que cuentan con las curvas de crecimiento infantil de la OMS (142). Los puntos de corte utilizados para IMC/E de niños de 2 a 5 años fueron:  $>3$  desvíos estándar (DE), obesidad;  $>2$  DE, sobrepeso;  $>1$  DE, riesgo de sobrepeso; entre  $<1$  DE y  $>-1$  DE, normopeso;  $\leq -1$  DE, riesgo de emaciación;  $\leq -2$  DE, emaciación;  $\leq -3$  DE, emaciación severa. En mayores de 5 años:  $\geq 2$  DE, obesidad;  $\geq 1$  DE, riesgo de sobrepeso; entre  $<1$  DE y  $\geq 2$  DE, normopeso;  $\leq -2$  DE, emaciación;  $\leq -3$  DE, emaciación severa.

### 6.2.3 Ingesta dietética

Los niños con TEA se clasificaron en dos grupos, el primero constituido por aquellos que llevaban una dieta sin gluten y caseína (TEA-dieta,  $n=19$ ) y el segundo formado por quienes no realizaban una dieta restrictiva (TEA-no dieta,  $n=16$ ).

Durante la misma entrevista en la que se tomaron los datos antropométricos, la investigadora nutricionista recolectó información sobre la ingesta dietética de los últimos tres meses. Para ello, se aplicó el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) del estudio SAYCARE (143), validado para niños y adolescentes de siete ciudades de América Latina. El mismo incluye un atlas fotográfico con el peso de cada alimento. Este cuestionario fue adaptado a nuestra población, para obtener más información sobre el consumo de alimentos sin gluten y sin caseína, debido a la relevancia para este estudio. El librito de fotos de alimentos, fue mostrado al momento de realizar el CFCA, para que los cuidadores y niños identifiquen el tamaño de la porción de comida. La cantidad de alimentos y bebidas consumidas se describió utilizando medidas caseras y, luego, se convirtió a gramos o mililitros, dependiendo del tipo de alimento. La ingesta diaria de cada alimento se estimó tomando en cuenta la frecuencia de consumo.

Los alimentos se organizaron en diferentes grupos: (1) lácteos, “total de lácteos”: leche, yogur, leche chocolatada, postres lácteos, queso; (2) “bebidas vegetales”: bebida de alpiste, castaña, almendra, avena, arroz y coco; (3) cereales, “cereales con gluten”: pasta, pan, galletitas, productos de panadería, cereales para desayuno, pizza y empanadas, “cereales sin gluten”: los mismos alimentos que el grupo anterior sin gluten, y se incluye el arroz, “total de cereales con y sin gluten”; (4) carnes y derivados y huevos, “total alimentos fuentes de proteínas”: carne, carne picada, pollo, cerdo, huevos, pescado fresco y enlatado y milanesa con y sin gluten (para la que se atribuyó un 25% de su peso al cereal); (5) manteca, ghee (grasa obtenida al calentar mantequilla de leche de vaca), aceite de coco, aceites y “total alimentos fuente de grasa”.

#### 6.2.4. Sensibilidad sensorial

Los padres completaron un cuestionario online validado para determinar la capacidad sensorial de sus hijos. Se aplicó la versión en español del Perfil Sensorial Corto (98) para establecer la frecuencia de los cambios sensoriales, conductuales o respuestas emocionales a los eventos de la vida diaria. El cuestionario tiene siete subescalas: sensibilidad táctil, sensibilidad al gusto/olor, sensibilidad al movimiento, falta de respuesta-búsqueda de sensaciones, audición, debilidad o cansancio y sensibilidad visual-auditiva. Cada ítem representa comportamientos infantiles observables y se califican en una escala de cinco puntos que va desde “siempre” a “nunca” (1: siempre, 2: frecuentemente, 3: ocasionalmente, 4: rara vez, 5: nunca) resultando en una puntuación máxima de 190 puntos. A su vez, la puntuación total obtenida se puede clasificar en tres categorías: funcionamiento típico (FT: 190-155), diferencia probable (DP: 154-142), diferencia definitiva (DD: 141-38). En nuestro caso y debido al tamaño pequeño de la muestra, agrupamos DP y DD, por lo que se utilizaron dos categorías (FT y DP + DD).

### 6.2.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Para las variables cuantitativas, los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Para evaluar la distribución de las variables, se utilizó el test Kolmogorov–Smirnov. Para analizar las características antropométricas, la ingesta dietética y la puntuación del perfil sensorial según el neurodesarrollo (TEA o DT), así como la dieta de los niños con TEA (TEA-dieta o TEA-no dieta), se aplicó prueba t para muestras independientes (para las variables que presentaron una distribución normal) y el test de Mann-Whitney (para variables sin distribución normal). Se consideró un nivel de significancia  $p < 0,05$  (dos colas).

Para estudiar la ingesta dietética de acuerdo al estado nutricional, normopeso (NP) y exceso de peso (EP), o al puntaje del perfil sensorial (FT y DP + DD) en TEA y DT, los alimentos que no presentaron distribución normal fueron transformados logarítmicamente (leche + yogur, queso, lácteos totales, cereales con y sin gluten, carne, carne picada, pollo, cerdo, milanesa con y sin gluten, huevos, pescado, alimentos proteicos totales, manteca, ghee, aceites y alimentos altos en grasa totales). El análisis de las variables se realizó aplicando ANCOVA de dos vías (ajustado por el peso al nacer, el puntaje total del perfil sensorial y con DSGC/dieta no restrictiva; o peso al nacer, estado nutricional y con DSGC/dieta no restringida, respectivamente), explorando los posibles efectos principales de los factores y las interacciones entre ellos. Las comparaciones por pares entre los distintos grupos se ajustaron mediante el test *post hoc* de Bonferroni. Las comparaciones entre NP y EP o entre FT y DP + DD en el total de participantes, se llevaron a cabo usando ANCOVA unidireccional y corrigiendo por potenciales factores de confusión (peso al nacer, puntaje total de perfil sensorial, y con DSGC/dieta no restrictiva; o peso al nacer, estado nutricional, y con DSGC/dieta no restrictiva, respectivamente).

### 6.3. Resultados

En la **Tabla 1** se presentan las características antropométricas y la ingesta dietética de los niños. Las medias de talla, peso, IMC, puntaje Z de IMC para la edad, puntaje Z de talla para la edad y peso al nacer no mostraron diferencias significativas entre los grupos TEA-dieta y TEA-no dieta, ni entre todos los niños con autismo y el grupo DT. Sin embargo, hubo una diferencia significativa en la media de edad entre el grupo TEA y el grupo DT ( $p=0,045$ ).

**Tabla 1.** Características antropométricas e ingesta dietética en niños con trastorno del espectro autista y desarrollo típico.

| PARÁMETROS                             | grupo TEA           |                        |                              |                     |                    |                              |
|----------------------------------------|---------------------|------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|------------------------------|
|                                        | TEA-dieta<br>(n=19) | TEA-no dieta<br>(n=16) | p*                           | grupo TEA<br>(n=35) | grupo DT<br>(n=30) | p**                          |
| <b>Características antropométricas</b> |                     |                        |                              |                     |                    |                              |
| Edad (años)                            | 6,05 ± 2,27         | 5,57 ± 1,91            | 0,688 <sup>1</sup>           | 5,83 ± 2,10         | 7,19 ± 2,56        | <b>0,045<sup>1</sup></b>     |
| Talla (cm)                             | 118,11 ± 13,74      | 117,83 ± 12,83         | 0,882 <sup>2</sup>           | 117,98 ± 13,14      | 125,43 ± 18,31     | 0,069 <sup>2</sup>           |
| Peso (Kg)                              | 23,47 ± 6,25        | 24,73 ± 6,00           | 0,766 <sup>1</sup>           | 24,05 ± 6,08        | 29,37 ± 11,78      | 0,266 <sup>1</sup>           |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )               | 16,60 ± 2,26        | 17,71 ± 2,27           | 0,233 <sup>1</sup>           | 17,11 ± 2,30        | 17,89 ± 2,70       | 0,469 <sup>1</sup>           |
| Puntaje Z del IMC para la edad         | 0,50 ± 1,48         | 1,37 ± 1,32            | 0,078 <sup>1</sup>           | 0,89 ± 1,45         | 0,92 ± 1,04        | 0,921 <sup>1</sup>           |
| Puntaje Z de la altura para la edad    | -0,003 ± 1,17       | 0,58 ± 1,12            | 0,140 <sup>2</sup>           | 0,26 ± 1,17         | 0,31 ± 1,19        | 0,833 <sup>2</sup>           |
| Peso al nacer (gr)                     | 3179,37 ± 690,53    | 3519,69 ± 694,47       | 0,157 <sup>2</sup>           | 3334,94 ± 703,42    | 3268,63 ± 462,58   | 0,651 <sup>2</sup>           |
| <b>Ingesta de alimentos</b>            | (n=18)              | (n=15)                 |                              | (n=33)              | (n=29)             |                              |
| <i>Productos lácteos</i>               |                     |                        |                              |                     |                    |                              |
| Leche + Yogurt (gr/día)                | 0,00 ± 0,00         | 191,89 ± 262,56        | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> | 87,22 ± 198,94      | 353,40 ± 237,32    | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> |
| Quesos (gr/día)                        | 0,71 ± 2,41         | 15,62 ± 14,17          | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> | 7,49 ± 12,15        | 16,60 ± 15,42      | <b>0,002<sup>1</sup></b>     |
| T. Lácteos (gr/día)                    | 0,71 ± 2,41         | 284,98 ± 275,95        | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> | 129,92 ± 232,33     | 401,95 ± 243,96    | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> |
| <i>Bebidas vegetales</i>               |                     |                        |                              |                     |                    |                              |
| Bebidas vegetales (ml/día)             | 399,33 ± 415,82     | 42,26 ± 104,59         | <b>0,003<sup>1</sup></b>     | 237,03 ± 359,50     | 26,72 ± 118,38     | <b>0,001<sup>1</sup></b>     |
| <i>Cereales</i>                        |                     |                        |                              |                     |                    |                              |

| PARÁMETROS                                | grupo TEA       |                 |                              |                 |                 |                              |
|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| Cereales con gluten (gr/día)              | 5,78 ± 10,32    | 210,32 ± 127,05 | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> | 98,75 ± 133,47  | 236,58 ± 107,65 | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> |
| Cereales sin gluten (gr/día)              | 138,97 ± 88,08  | 42,61 ± 65,21   | <b>0,001<sup>1</sup></b>     | 95,17 ± 80,39   | 27,14 ± 57,71   | <b>0,003<sup>1</sup></b>     |
| T. Cereales (con y sin gluten) (gr/día)   | 144,76 ± 88,37  | 252,93 ± 119,18 | <b>0,005<sup>2</sup></b>     | 193,93 ± 115,56 | 266,68 ± 104,90 | <b>0,009<sup>2</sup></b>     |
| <i>Carnes y derivados, y huevos</i>       |                 |                 |                              |                 |                 |                              |
| Carne (gr/día)                            | 43,15 ± 26,20   | 34,05 ± 27,09   | 0,291 <sup>1</sup>           | 39,01 ± 26,59   | 31,65 ± 18,20   | 0,335 <sup>1</sup>           |
| Carne picada (gr/día)                     | 50,70 ± 114,79  | 21,06 ± 23,91   | 0,340 <sup>1</sup>           | 37,23 ± 86,46   | 19,49 ± 14,57   | 0,718 <sup>1</sup>           |
| Pollo (gr/día)                            | 34,38 ± 27,98   | 48,60 ± 58,34   | 0,360 <sup>1</sup>           | 40,84 ± 44,24   | 29,51 ± 19,35   | 0,466 <sup>1</sup>           |
| Cerdo (gr/día)                            | 14,92 ± 22,21   | 3,21 ± 4,61     | 0,128 <sup>1</sup>           | 9,60 ± 17,50    | 2,57 ± 3,59     | 0,307 <sup>1</sup>           |
| Milanesa con gluten (gr/día)              | 3,07 ± 7,17     | 28,04 ± 45,10   | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> | 14,42 ± 32,81   | 16,10 ± 12,74   | <b>0,014<sup>1</sup></b>     |
| Milanesa sin gluten (gr/día)              | 10,25 ± 16,25   | 0,35 ± 1,35     | <b>0,004<sup>1</sup></b>     | 5,75 ± 12,89    | 1,24 ± 4,33     | <b>0,032<sup>1</sup></b>     |
| Huevos (gr/día)                           | 43,70 ± 68,38   | 29,00 ± 34,70   | 0,456 <sup>1</sup>           | 37,01 ± 55,37   | 27,37 ± 18,79   | 0,588 <sup>1</sup>           |
| <i>Pescado</i>                            |                 |                 |                              |                 |                 |                              |
| Pescado fresco (gr/día)                   | 0,04 ± 0,18     | 0,00 ± 0,00     | 0,361 <sup>1</sup>           | 0,02 ± 0,13     | 8,22 ± 7,99     | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> |
| Pescado enlatado (gr/día)                 | 0,00 ± 0,00     | 0,00 ± 0,00     | 0,533 <sup>1</sup>           | 0,00 ± 0,00     | 5,73 ± 9,89     | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> |
| Pescado (fresco y enlatado) (gr/día)      | 0,04 ± 0,18     | 0,00 ± 0,00     | 0,361 <sup>1</sup>           | 0,02 ± 0,13     | 13,97 ± 12,54   | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> |
| T. alimentos fuente de proteínas (gr/día) | 206,05 ± 129,84 | 183,21 ± 98,64  | 0,656 <sup>1</sup>           | 195,67 ± 115,53 | 160,84 ± 50,69  | 0,386 <sup>1</sup>           |
| <i>Manteca, ghee y aceites</i>            |                 |                 |                              |                 |                 |                              |
| Manteca (gr/día)                          | 0,07 ± 0,33     | 2,17 ± 6,35     | <b>0,016<sup>1</sup></b>     | 1,03 ± 4,34     | 2,93 ± 5,36     | <b>0,004<sup>1</sup></b>     |
| Ghee (gr/día)                             | 1,90 ± 5,85     | 0,00 ± 0,00     | <b>0,008<sup>1</sup></b>     | 1,03 ± 4,37     | 0,06 ± 0,26     | 0,201 <sup>1</sup>           |
| Aceite de coco (gr/día)                   | 9,69 ± 11,51    | 0,48 ± 1,28     | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> | 5,50 ± 9,63     | 0,95 ± 3,49     | <b>0,006<sup>1</sup></b>     |
| Aceites (gr/día)                          | 27,16 ± 18,69   | 18,60 ± 11,73   | 0,122 <sup>1</sup>           | 23,27 ± 16,26   | 20,23 ± 13,24   | 0,494 <sup>1</sup>           |
| T. alimentos fuente de grasa (gr/día)     | 40,22 ± 22,93   | 21,25 ± 13,85   | <b>0,007<sup>1</sup></b>     | 31,60 ± 21,33   | 24,18 ± 15,57   | 0,203 <sup>1</sup>           |

Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita):  $p < 0,05$  (<sup>1</sup> test Mann-Whitney, <sup>2</sup> Prueba t). TEA: trastorno del espectro autista; TEA-dieta: niños con TEA con dieta sin gluten y sin caseína; TEA-no dieta: niños con TEA sin dieta restrictiva; DT: desarrollo típico; IMC: índice de masa corporal; CFCA: cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos; T: total. Comparación entre: \* TEA-dieta y TEA-no dieta, \*\* grupo TEA y grupo DT.

Como era de esperar, los niños del grupo TEA-dieta consumieron una cantidad significativamente menor de productos lácteos totales ( $p<0,001$ ), cereales con gluten ( $p<0,001$ ), cereales totales ( $p=0,005$ ), milanesa con gluten ( $p<0,001$ ) y manteca ( $p=0,016$ ) que el grupo TEA-no dieta. El grupo TEA consumió una cantidad significativamente menor de estos productos en comparación al grupo DT: productos lácteos totales ( $p<0,001$ ), cereales con gluten ( $p<0,001$ ), cereales totales ( $p<0,009$ ), milanesa con gluten ( $p<0,014$ ) y manteca ( $p=0,004$ ). Por el contrario, la ingesta media de bebidas vegetales ( $p=0,003$ ), cereales sin gluten ( $p=0,001$ ), milanesa sin gluten ( $p=0,004$ ) y aceite de coco ( $p<0,001$ ) fue mayor en el grupo TEA-dieta que en el grupo TEA-no dieta, y también hubo una diferencia significativa entre los grupos TEA y neurotípicos (bebidas vegetales:  $p=0,001$ ; cereales sin gluten:  $p=0,003$ ; milanesa sin gluten:  $p=0,032$ ; aceite de coco:  $p=0,006$ ). Los niños con TEA que tenían una DSGC consumieron significativamente más ghee ( $p<0,008$ ) y alimentos altos en grasa totales ( $p=0,007$ ) que aquellos sin una dieta restringida. Además, en el grupo TEA, la ingesta de pescado fue menor que en el grupo DT ( $p<0,001$ ).

En la **Tabla 2** se muestran las puntuaciones promedio en los grupos TEA, TEA-dieta, TEA-no dieta y DT para los diferentes ítems del cuestionario PSC. Las puntuaciones de sensibilidad táctil ( $p<0,001$ ), sensibilidad gustativa/olfativa ( $p=0,005$ ), baja respuesta sensorial-búsqueda de sensaciones ( $p<0,001$ ), filtro auditivo ( $p<0,001$ ) y el perfil sensorial total ( $p<0,001$ ) fueron significativamente mayores en el grupo DT que en el grupo TEA, mostrando mayor sensibilidad en los participantes con autismo. Cuando el tipo de alimentación también fue considerado, se obtuvo en el grupo TEA-no dieta una puntuación significativamente más alta en sensibilidad visual-auditiva ( $p<0,001$ ) y debilidad o cansancio ( $p=0,010$ ) que el grupo TEA-dieta.

**Tabla 2.** Perfil sensorial en niños con trastorno del espectro autista y con desarrollo típico.

| COMPONENTES DEL PERFIL SENSORIAL (PUNTAJES)      | TEA-dieta (n=19) | TEA-no dieta (n=16) | p*                           | TEA (n=35)     | DT (n=30)      | p**                          |
|--------------------------------------------------|------------------|---------------------|------------------------------|----------------|----------------|------------------------------|
| Sensibilidad táctil                              | 29,37 ± 3,23     | 29,19 ± 4,47        | 0,891 <sup>1</sup>           | 29,29 ± 3,79   | 33,40 ± 1,69   | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> |
| Sensibilidad gustativa/olfativa                  | 14,21 ± 4,82     | 12,06 ± 5,77        | 0,239 <sup>1</sup>           | 13,63 ± 2,27   | 16,83 ± 3,48   | <b>0,005<sup>1</sup></b>     |
| Sensibilidad al movimiento                       | 13,32 ± 2,79     | 14,00 ± 1,46        | 0,411 <sup>1</sup>           | 13,87 ± 1,40   | 14,00 ± 1,64   | 0,629 <sup>1</sup>           |
| Baja respuesta sensorial/búsqueda de sensaciones | 21,37 ± 5,18     | 21,13 ± 5,57        | 0,894 <sup>2</sup>           | 21,26 ± 5,28   | 29,27 ± 4,88   | <b>&lt;0,001<sup>2</sup></b> |
| Filtro auditivo                                  | 20,79 ± 3,22     | 21,19 ± 3,92        | 0,744 <sup>1</sup>           | 20,97 ± 3,51   | 27,23 ± 1,77   | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> |
| Baja energía/débil                               | 25,84 ± 4,91     | 29,06 ± 1,80        | <b>0,010<sup>1</sup></b>     | 27,31 ± 4,10   | 27,23 ± 3,31   | 0,546 <sup>1</sup>           |
| Sensibilidad visual/auditiva                     | 18,16 ± 4,41     | 24,13 ± 1,31        | <b>&lt;0,001<sup>1</sup></b> | 20,89 ± 4,49   | 21,13 ± 4,16   | 0,841 <sup>1</sup>           |
| Puntaje total del Perfil Sensorial Corto         | 143,28 ± 16,35   | 150,75 ± 17,95      | 0,301 <sup>2</sup>           | 146,70 ± 17,26 | 169,10 ± 10,39 | <b>&lt;0,001<sup>2</sup></b> |

Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita): p<0,05 (<sup>1</sup> test Mann-Whitney, <sup>2</sup> Prueba t de Student). TEA: trastorno del espectro autista; TEA-dieta: niños con TEA con dieta sin gluten y sin caseína; TEA-no dieta: niños con TEA sin dieta restrictiva; DT: desarrollo típico. Comparación entre: \* TEA-dieta y TEA-no dieta, \*\* grupo TEA y grupo DT.

En la **Tabla 3** se comparó la ingesta dietética según el estado nutricional (NP vs EP) y el neurodesarrollo (TEA vs DT) mediante ANCOVA de dos vías, para explorar los posibles efectos principales de los factores y las interacciones entre ellos. Solamente la ingesta de aceite de coco mostró una interacción significativa entre el estado nutricional y los grupos TEA/DT ( $F(1, 16) = 7,589$ ,  $p=0,014$ ,  $\eta^2=0,322$ ). El factor estado nutricional también mostró un efecto principal sobre el aceite de coco ( $F(1, 16) = 6,004$ ,  $p=0,026$ ,  $\eta^2=0,273$ ). Presentar TEA o DT tuvo un efecto principal, estadísticamente significativo sobre la ingesta de leche + yogur ( $F(1, 30) = 6,299$ ,  $p=0,018$ ,  $\eta^2=0,174$ ). Los niños con TEA con normopeso tuvieron una media significativamente menor de ingesta de leche + yogur ( $p=0,007$ ) y del total de lácteos ( $p=0,014$ ), y una ingesta significativamente mayor de carne picada ( $p=0,010$ ) y aceite de coco ( $p=0,011$ ) que los niños con normopeso del grupo DT. Además, en el grupo con DT, los niños con normopeso consumían una cantidad significativamente menor de aceite de coco

( $p=0,003$ ) que aquellos con exceso de peso. Sin embargo, en el grupo todos (TEA + DT), los niños con normopeso tuvieron una mayor ingesta de aceite de coco ( $p=0,026$ ) que los que tenían exceso de peso.

**Tabla 3.** Comparación de la ingesta dietética según el estado nutricional (normopeso vs. exceso de peso) y los grupos de neurodesarrollo (trastorno del espectro autista vs. desarrollo típico) mediante ANCOVA de dos vías.

| INGESTA DE ALIMENTOS         | grupo TEA        |                                 | grupo DT         |                                | Todos            |                                 | Comparaciones por pares |                |                |                |                | Efectos principales       |                        | Interacciones                        |
|------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------|------------------------|--------------------------------------|
|                              | Normopeso (n=20) | Exceso de peso (SP + OB) (n=11) | Normopeso (n=20) | Exceso de peso (SP + OB) (n=9) | Normopeso (n=41) | Exceso de peso (SP + OB) (n=20) | p <sup>1</sup>          | p <sup>2</sup> | p <sup>3</sup> | p <sup>4</sup> | p <sup>5</sup> | Factor estado nutricional | Factor neurodesarrollo | Estado nutricional x Neurodesarrollo |
| <i>Productos lácteos</i>     |                  |                                 |                  |                                |                  |                                 |                         |                |                |                |                |                           |                        |                                      |
| Leche + Yogurt (gr/día)      | 81,23 ± 189,59   | 106,59 ± 231,30                 | 400,69 ± 244,35  | 248,33 ± 193,17                | 237,06 ± 269,20  | 170,37 ± 221,59                 | 0,848                   | 0,224          | <b>0,007</b>   | 0,243          | 0,614          | NS                        | **                     | NS                                   |
| Quesos (gr/día)              | 5,02 ± 10,11     | 12,90 ± 14,76                   | 17,64 ± 15,21    | 14,30 ± 16,54                  | 11,17 ± 14,21    | 13,53 ± 15,18                   | 0,901                   | 0,140          | 0,079          | 0,831          | 0,400          | NS                        | NS                     | NS                                   |
| T. Lácteos (gr/día)          | 120,10 ± 229,46  | 160,49 ± 253,98                 | 453,36 ± 248,11  | 287,70 ± 202,04                | 282,67 ± 289,84  | 217,73 ± 235,27                 | 0,588                   | 0,102          | <b>0,014</b>   | 0,697          | 0,530          | NS                        | NS                     | NS                                   |
| <i>Bebidas vegetales</i>     |                  |                                 |                  |                                |                  |                                 |                         |                |                |                |                |                           |                        |                                      |
| Bebidas vegetales (ml/día)   | 295,85 ± 403,33  | 89,45 ± 204,80                  | 38,75 ± 141,99   | 0,00 ± 0,00                    | 170,43 ± 328,39  | 49,20 ± 155,43                  | 0,266                   | -              | 0,382          | -              | 0,506          | NS                        | NS                     | -                                    |
| <i>Cereales</i>              |                  |                                 |                  |                                |                  |                                 |                         |                |                |                |                |                           |                        |                                      |
| Cereales con gluten (gr/día) | 79,66 ± 127,14   | 142,71 ± 145,27                 | 246,18 ± 104,89  | 215,25 ± 116,99                | 160,89 ± 142,86  | 175,35 ± 135,06                 | 0,245                   | 0,544          | 0,079          | 0,980          | 0,688          | NS                        | NS                     | NS                                   |
| Cereales sin gluten (gr/día) | 107,07 ± 96,66   | 77,23 ± 84,41                   | 18,94 ± 24,44    | 54,88 ± 96,75                  | 64,08 ± 83,33    | 67,17 ± 88,44                   | 0,274                   | 0,271          | 0,131          | 0,525          | 0,725          | NS                        | NS                     | NS                                   |

|                                           |                |                |                |                |                |                |       |              |              |       |              |    |    |     |
|-------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|--------------|--------------|-------|--------------|----|----|-----|
| T. Cereales (con y sin gluten) (gr/día)   | 186,73 ±108,84 | 219,95 ±127,93 | 265,13 ±105,57 | 270,13 ±109,65 | 224,97 ±113,09 | 242,53 ±119,72 | 0,697 | 0,564        | 0,289        | 0,115 | 0,898        | NS | NS | NS  |
| <i>Carnes y derivados, y huevos</i>       |                |                |                |                |                |                |       |              |              |       |              |    |    |     |
| Carne (gr/día)                            | 37,07 ±25,47   | 44,45 ±29,81   | 33,80 ±20,13   | 26,88 ±12,65   | 35,47 ±22,79   | 36,55 ±24,81   | 0,202 | 0,676        | 0,465        | 0,455 | 0,537        | NS | NS | NS  |
| Carne picada (gr/día)                     | 21,13 ±24,79   | 70,07 ±144,59  | 20,54 ±15,11   | 17,17 ±13,85   | 20,84 ±20,39   | 46,27 ±108,69  | 0,250 | 0,683        | <b>0,010</b> | 0,994 | 0,185        | NS | NS | NS  |
| Pollo (gr/día)                            | 43,47 ±52,78   | 38,27 ±24,40   | 29,10 ±21,50   | 30,44 ±14,51   | 36,46 ±40,81   | 34,75 ±20,44   | 0,956 | 0,722        | 0,474        | 0,74  | 0,775        | NS | NS | NS  |
| Cerdo (gr/día)                            | 12,23 ±20,81   | 4,16 ±8,08     | 2,60 ±3,32     | 2,51 ±4,36     | 7,53 ±15,67    | 3,42 ±6,56     | 0,685 | 0,696        | 0,527        | 0,627 | 0,576        | NS | NS | NS  |
| Milanesa con gluten (gr/día)              | 15,72 ±40,73   | 12,76 ±10,56   | 13,37 ±9,70    | 22,16 ±16,86   | 14,57 ±29,59   | 16,99 ±14,19   | 0,891 | 0,175        | 0,798        | 0,457 | 0,296        | NS | NS | NS  |
| Milanesa sin gluten (gr/día)              | 6,17 ±10,02    | 5,45 ±18,09    | 1,80 ±5,16     | 0,00 ±0,00     | 4,04 ±8,23     | 3,00 ±13,41    | 0,067 | .            | 0,557        | .     | 0,152        | NS | NS | NS  |
| Huevos (gr/día)                           | 46,85 ±66,02   | 21,60 ±22,18   | 29,49 ±19,88   | 22,66 ±16,13   | 38,38 ±49,44   | 22,08 ±19,20   | 0,395 | 0,504        | 0,530        | 0,462 | 0,285        | NS | NS | NS  |
| <i>Pescado</i>                            |                |                |                |                |                |                |       |              |              |       |              |    |    |     |
| Pescado fresco (gr/día)                   | 0,04 ± 0,17    | 0,00 ± 0,00    | 7,00 ± 5,13    | 10,95 ± 12,19  | 3,43 ± 4,99    | 4,93 ± 9,69    | -     | 0,942        | -            | -     | -            | NS | -  | -   |
| Pescado enlatado (gr/día)                 | 0,00 ± 0,00    | 0,00 ± 0,00    | 7,76 ± 11,15   | 1,24 ± 3,73    | 3,78 ± 8,63    | 0,56 ± 2,50    | -     | 0,809        | -            | -     | 0,809        | NS | -  | -   |
| Pescado (fresco and enlatado) (gr/día)    | 0,04 ± 0,17    | 0,00 ± 0,00    | 14,76 ± 11,27  | 12,20 ± 15,62  | 7,22 ± 10,76   | 5,49 ± 11,89   | -     | 0,129        | .            | .     | .            | NS | .  | .   |
| T. alimentos fuente de proteínas (gr/día) | 193,77 ±95,40  | 210,89 ±150,39 | 163,09 ±51,59  | 155,85 ±51,31  | 178,80 ±77,82  | 186,12 ±117,48 | 0,815 | 0,667        | 0,339        | 0,542 | 0,641        | NS | NS | NS  |
| <i>Manteca, ghee and aceites</i>          |                |                |                |                |                |                |       |              |              |       |              |    |    |     |
| Manteca (gr/día)                          | 0,29 ± 0,63    | 2,52 ± 7,47    | 3,55 ± 6,06    | 1,55 ± 3,21    | 1,88 ± 4,51    | 2,09 ± 5,83    | 0,590 | 0,104        | 0,306        | 0,517 | 0,847        | NS | NS | NS  |
| Ghee (gr/día)                             | 1,62 ± 5,44    | 0,00 ± 0,00    | 0,08 ± 0,31    | 0,00 ± 0,00    | 0,87 ± 3,93    | 0,00 ± 0,00    | .     | .            | .            | .     | .            | NS | NS | NS  |
| Aceite de coco (gr/día)                   | 7,79 ± 11,22   | 1,64 ± 3,87    | 0,03 ± 0,06    | 3,00 ± 6,00    | 4,00 ± 8,85    | 2,25 ± 4,85    | 0,718 | <b>0,003</b> | <b>0,011</b> | 0,552 | <b>0,026</b> | *  | NS | *** |
| Aceites (gr/día)                          | 23,23 ± 17,64  | 23,18 ± 14,96  | 20,65 ± 14,96  | 19,32 ± 9,00   | 21,97 ± 16,23  | 21,44 ± 12,48  | 0,648 | 0,927        | 0,633        | 0,961 | 0,796        | NS | NS | NS  |

|                                       |               |               |               |               |               |               |       |       |       |       |       |    |    |    |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|----|----|----|
| T. alimentos fuente de grasa (gr/día) | 34,13 ± 23,76 | 27,35 ± 17,03 | 24,32 ± 16,94 | 23,87 ± 12,92 | 29,35 ± 21,05 | 25,79 ± 15,04 | 0,924 | 0,979 | 0,627 | 0,773 | 0,961 | NS | NS | NS |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|----|----|----|

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita,  $p < 0,05$  ajustado por peso al nacer, perfil sensorial, con/sin dieta): (a) ANCOVA de dos vías, comparaciones entre <sup>1</sup> normopeso y exceso de peso en el grupo TEA, <sup>2</sup> normopeso y exceso de peso en el grupo DT, <sup>3</sup> normopeso en TEA y DT <sup>4</sup> exceso de peso en TEA y DT; \*efecto principal significativo del factor estado nutricional, \*\*efecto principal significativo del factor neurodesarrollo, \*\*\* interacciones significativas entre estado nutricional y neurodesarrollo (efectos principales significativos y las interacciones se describen en la sección resultados), NS: no significativo; (b) ANCOVA de una vía, comparación entre <sup>5</sup> normopeso y exceso de peso en todos los participantes. TEA: trastorno del espectro autista; DT: desarrollo típico, T: total, SP: sobrepeso, OB: obesidad, Todos: niños TEA + DT.

En la **Tabla 4**, se comparó la ingesta dietética según el perfil sensorial (PT vs DP + DD) y los grupos de neurodesarrollo (TEA vs DT) mediante ANCOVA de dos vías. El factor perfil sensorial mostró un efecto principal significativo sobre la ingesta de queso ( $F(1, 35) = 7,533$ ,  $p = 0,009$ ,  $\eta^2 = 0,177$ ). El factor neurodesarrollo mostró un efecto principal significativo sobre el aceite de coco ( $F(1, 17) = 4,489$ ,  $p = 0,049$ ,  $\eta^2 = 0,209$ ). En el grupo TEA, los niños con FT consumieron mayor cantidad de leche + yogur ( $p = 0,009$ ), productos lácteos totales ( $p = 0,019$ ) y carne ( $p = 0,047$ ); y menor cantidad de cereales totales (con y sin gluten) ( $p = 0,036$ ) y alimentos proteicos totales ( $p = 0,034$ ), que los niños con DP + DD. Los niños con TEA y DT tuvieron una menor ingesta de leche + yogur ( $p = 0,004$ ) y productos lácteos totales ( $p = 0,037$ ), y un mayor consumo de aceite de coco ( $p = 0,049$ ), que los niños con DT con FT. Cuando se estudió a todos los niños (TEA y DT), aquellos con FT mostraron una mayor ingesta de queso que el grupo DP + DD ( $p = 0,009$ ).

**Tabla 4.** Comparación de la ingesta dietética según el perfil sensorial (funcionamiento típico vs. diferencia probable + diferencia definitiva) y los grupos de neurodesarrollo (trastorno del espectro autista vs. desarrollo típico) mediante ANCOVA de dos vías.

| INGESTA DE ALIMENTOS                    | grupo TEA                    |                                         | grupo DT                     |                                        | Todos                        |                                         | Comparación por pares |                |                |                |                | Efectos principales     |                        | Interacciones  |
|-----------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------|------------------------|----------------|
|                                         | Funcionamiento típico (n=11) | Diferencia Probable + Definitiva (n=21) | Funcionamiento típico (n=27) | Diferencia Probable + Definitiva (n=2) | Funcionamiento típico (n=38) | Diferencia Probable + Definitiva (n=23) | p <sup>1</sup>        | p <sup>2</sup> | p <sup>3</sup> | p <sup>4</sup> | p <sup>5</sup> | Factor perfil sensorial | Factor neurodesarrollo | Factor PS x ND |
| <i>Productos lácteos</i>                |                              |                                         |                              |                                        |                              |                                         |                       |                |                |                |                |                         |                        |                |
| Leche + Yogurt (gr/día)                 | 95,18 ± 186,15               | 87,21 ± 213,50                          | 358,28 ± 244,94              | 287,50 ± 88,38                         | 282,12 ± 257,19              | 104,62 ± 212,42                         | <b>0,009</b>          | 0,958          | <b>0,004</b>   | 0,640          | 0,085          | NS                      | NS                     | NS             |
| Quesos (gr/día)                         | 8,91 ± 12,37                 | 7,10 ± 12,48                            | 14,36 ± 13,43                | 46,80 ± 2,54                           | 12,78 ± 13,21                | 10,56 ± 16,51                           | 0,064                 | 0,051          | 0,274          | 0,292          | <b>0,009</b>   | *                       | NS                     | NS             |
| T. Lácteos (gr/día)                     | 8,91 ± 12,37                 | 7,10 ± 12,48                            | 14,36 ± 13,43                | 46,80 ± 2,54                           | 12,78 ± 13,21                | 10,56 ± 16,51                           | <b>0,019</b>          | 0,532          | <b>0,037</b>   | 0,950          | 0,061          | NS                      | NS                     | NS             |
| <i>Bebidas vegetales</i>                |                              |                                         |                              |                                        |                              |                                         |                       |                |                |                |                |                         |                        |                |
| Bebidas vegetales (ml/día)              | 206,54 ± 378,24              | 234,52 ± 356,66                         | 28,70 ± 122,61               | 0,00 ± 0,00                            | 80,18 ± 236,45               | 214,13 ± 346,71                         | 0,367                 |                | 0,365          |                | 0,228          | NS                      | NS                     | NS             |
| <i>Cereales</i>                         |                              |                                         |                              |                                        |                              |                                         |                       |                |                |                |                |                         |                        |                |
| Cereales con gluten (gr/día)            | 104,24 ± 105,77              | 99,81 ± 150,17                          | 237,04 ± 111,57              | 230,40 ± 27,44                         | 198,60 ± 124,48              | 111,17 ± 148,16                         | 0,148                 | 0,962          | 0,152          | 0,991          | 0,458          | NS                      | NS                     | NS             |
| Cereales sin gluten (gr/día)            | 69,06 ± 71,86                | 111,35 ± 100,00                         | 30,84 ± 60,14                | 20,00 ± 0,00                           | 41,90 ± 65,16                | 103,40 ± 98,91                          | 0,289                 | 0,591          | 0,755          | 0,152          | 0,936          | NS                      | NS                     | NS             |
| T. Cereales (con y sin gluten) (gr/día) | 130,15 ± 97,38               | 173,25 ± 117,86                         | 235,17 ± 103,72              | 216,43 ± 6,54                          | 204,77 ± 111,59              | 177,00 ± 113,07                         | <b>0,036</b>          | 0,799          | <b>0,06</b>    | 0,672          | 0,419          | NS                      | NS                     | NS             |
| <i>Carnes y derivados, y huevos</i>     |                              |                                         |                              |                                        |                              |                                         |                       |                |                |                |                |                         |                        |                |
| Carne (gr/día)                          | 45,36 ± 29,14                | 36,60 ± 25,70                           | 31,07 ± 18,75                | 39,50 ± 0,70                           | 35,21 ± 22,80                | 36,85 ± 24,52                           | <b>0,047</b>          | 0,632          | 0,912          | 0,153          | 0,578          | NS                      | NS                     | NS             |
| Carne picada (gr/día)                   | 14,74 ± 16,79                | 50,11 ± 106,49                          | 17,97 ± 13,92                | 40,00 ± 0,00                           | 17,04 ± 14,65                | 49,23 ± 101,57                          | 0,247                 | 0,268          | 0,203          | 0,291          | 0,13           | NS                      | NS                     | NS             |

|                                           |                |                 |                |                |                |                 |              |       |              |       |       |    |    |    |
|-------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|--------------|-------|--------------|-------|-------|----|----|----|
| Pollo (gr/día)                            | 26,54 ± 13,50  | 49,61 ± 53,01   | 29,48 ± 19,88  | 30,00 ± 14,14  | 28,63 ± 18,14  | 47,91 ± 50,95   | 0,137        | 0,739 | 0,594        | 0,469 | 0,313 | NS | NS | NS |
| Cerdo (gr/día)                            | 7,03 ± 12,09   | 10,73 ± 20,28   | 2,62 ± 3,71    | 1,90 ± 1,55    | 3,90 ± 7,30    | 9,96 ± 19,50    | 0,736        | 0,899 | 0,55         | 0,998 | 0,959 | NS | NS | NS |
| Milanesa con gluten (gr/día)              | 11,12 ± 10,91  | 16,58 ± 40,59   | 16,10 ± 12,64  | 16,12 ± 19,62  | 14,66 ± 12,24  | 16,54 ± 38,93   | 0,179        | 0,586 | 0,632        | 0,33  | 0,859 | NS | NS | NS |
| Milanesa sin gluten (gr/día)              | 1,70 ± 2,37    | 8,14 ± 15,70    | 1,33 ± 4,48    | 0,00 ± 0,00    | 1,44 ± 3,96    | 7,43 ± 15,15    | 0,118        | .     | 0,517        | .     | 0,342 | NS | NS | NS |
| Huevos (gr/día)                           | 27,81 ± 34,52  | 42,60 ± 64,41   | 28,08 ± 19,23  | 17,79 ± 8,06   | 28,01 ± 24,12  | 41,34 ± 61,89   | 0,374        | 0,762 | 0,282        | 0,817 | 0,849 | NS | NS | NS |
| <i>Pescado</i>                            |                |                 |                |                |                |                 |              |       |              |       |       |    |    |    |
| Pescado fresco (gr/día)                   | 0,00 ± 0,00    | 0,03 ± 0,17     | 7,133 ± 5,33   | 23,00 ± 24,04  | 5,06 ± 5,54    | 2,03 ± 8,37     | .            | 0,168 | .            | .     | .     | NS | .  | .  |
| Pescado enlatado (gr/día)                 | 0,00 ± 0,00    | 0,00 ± 0,00     | 5,33 ± 10,14   | 11,20 ± 0,00   | 0,97 ± 3,22    | 2,72 ± 7,34     | .            | 0,892 | .            | .     | 0,892 | NS | .  | .  |
| Pescado (fresco and enlatado) (gr/día)    | 0,00 ± 0,00    | 0,04 ± 0,17     | 12,47 ± 10,65  | 34,20 ± 24,04  | 8,86 ± 10,60   | 3,01 ± 11,09    | .            | 0,085 | .            | .     | .     | NS | .  | .  |
| T. alimentos fuente de proteínas (gr/día) | 147,08 ± 62,82 | 227,20 ± 127,38 | 158,73 ± 50,84 | 189,31 ± 54,88 | 155,36 ± 53,96 | 223,90 ± 122,50 | <b>0,034</b> | 0,515 | 0,423        | 0,905 | 0,112 | NS | NS | NS |
| <i>Manteca, ghee and aceites</i>          |                |                 |                |                |                |                 |              |       |              |       |       |    |    |    |
| Manteca (gr/día)                          | 0,43 ± 0,76    | 1,39 ± 5,43     | 2,86 ± 5,45    | 3,90 ± 5,51    | 2,16 ± 4,72    | 1,60 ± 5,36     | 0,674        | 0,388 | 0,637        | 0,525 | 0,335 | NS | NS | NS |
| Ghee (gr/día)                             | 0,29 ± 0,67    | 1,47 ± 5,46     | 0,06 ± 0,27    | 0,00 ± 0,00    | 0,13 ± 0,43    | 1,34 ± 5,22     | 0,605        | .     | .            | .     | .     | NS | .  | .  |
| Aceite de coco (gr/día)                   | 5,43 ± 11,54   | 5,80 ± 8,96     | 1,02 ± 3,62    | 0,00 ± 0,00    | 2,30 ± 7,02    | 5,30 ± 8,70     | 0,436        | .     | <b>0,049</b> | .     | 0,65  | NS | ** | NS |
| Aceites (gr/día)                          | 22,08 ± 16,19  | 23,81 ± 17,05   | 18,95 ± 12,34  | 37,50 ± 17,67  | 19,86 ± 13,41  | 25,00 ± 17,15   | 0,576        | 0,15  | 0,984        | 0,283 | 0,129 | NS | NS | NS |
| T. alimentos fuente de grasa (gr/día)     | 28,24 ± 24,25  | 33,67 ± 20,53   | 22,91 ± 14,70  | 41,40 ± 23,19  | 24,45 ± 17,79  | 34,34 ± 20,31   | 0,745        | 0,189 | 0,858        | 0,25  | 0,194 | NS | NS | NS |

Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita,  $p < 0,05$  ajustado por peso al nacer, perfil sensorial, con/sin dieta): (a) ANCOVA de dos vías, comparaciones entre: <sup>1</sup> funcionamiento típico y diferencia probable + diferencia definitiva en grupo TEA, <sup>2</sup> funcionamiento típico y diferencia probable + diferencia definitiva en grupo DT, <sup>3</sup> funcionamiento típico en TEA y DT,

<sup>4</sup> diferencia probable + diferencia definida en TEA y DT, \* efecto principal significativo del factor perfil sensorial, \*\* efecto principal significativo del factor neurodesarrollo (los efectos principalmente significativos y las interacciones se describen en la sección resultados), NS: no significativo; (b) ANCOVA de una vía, comparación entre <sup>5</sup> funcionamiento típico y diferencia probable + diferencia definitiva en todos los participantes. TEA: trastorno del espectro autista; DT: desarrollo típico, T: total, PS: perfil sensorial, ND: neurodesarrollo, Todos: niños TEA y DT.

## 6.4. Discusión

El objetivo de este estudio fue describir y analizar la ingesta dietética de niños con y sin autismo en relación a su estado nutricional y sensibilidad sensorial. Los principales hallazgos que obtuvimos fueron que los niños con TEA que presentaban una mayor sensibilidad sensorial (diferencia probable o definitiva en su perfil sensorial), tuvieron una menor ingesta de lácteos, y una mayor ingesta de cereales y alimentos fuente de proteínas que los niños con TEA y funcionamiento sensorial típico.

Considerando exclusivamente la ingesta de alimentos, en concordancia con nuestros resultados, luego de una revisión sistemática de estudios de cohorte Ristory et al. (44) mostraron que no hubo diferencia en la ingesta de alimentos proteicos entre los grupos TEA y DT. Sin embargo, en cuanto a la ingesta de pescado, nosotras observamos que los niños con autismo consumían una cantidad significativamente menor de pescado fresco y en conserva que el grupo de niños con desarrollo típico. Particularmente, otro estudio que analizó la alimentación en niños con autismo y neurotípicos encontró que el 27% de los niños con TEA nunca consumieron pescado (134). Este menor consumo podría ser preocupante ya que, en un estudio de los Países Bajos, una mayor ingesta de pescado se asoció a una mejor función cognitiva en adolescentes (144). A su vez, Plaza-Díaz et al. (145) señalaron que los niveles bajos de ácido docosahexaenoico (DHA) se asocian a daños en el lenguaje y en las habilidades motoras de los niños, pero no encontraron diferencias significativas en la ingesta diaria promedio de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) + DHA, contenidos en el pescado, entre el grupo TEA y el grupo control; quizás debido a un consumo tradicionalmente mayor del mismo en España, en comparación con otros países.

Por otra parte, aunque no existen pruebas concluyentes que demuestren que una dieta sin gluten y sin caseína mejora los síntomas del TEA, actualmente es una de las intervenciones más populares (146). Una dieta libre de gluten consiste en la eliminación de todos los alimentos que contienen trigo, cebada y centeno, incluyendo a las harinas, pan, pastas y otros productos de panadería hechos con estos cereales; mientras que una dieta libre de

caseína se basa en evitar productos lácteos como leche, yogur, queso, manteca, crema de leche, helado, entre otros (147). Como era de esperar, se observó un menor consumo de cereales con gluten y de lácteos en los niños con autismo que llevaban una DSGC, junto con un menor consumo de gluten y caseína en el grupo total TEA (TEA-dieta + TEA-no dieta) en comparación a los participantes con desarrollo típico.

Consecuentemente, la presencia de una mayor ingesta de bebidas vegetales en el grupo TEA-dieta, en comparación con el grupo que no realizaba dieta, puede deberse al uso de tales productos en reemplazo de los lácteos (148, 149). Aún no está claro si el consumo de bebidas vegetales está asociado a beneficios sobre la salud (148). Estas bebidas son extracciones líquidas de frutos secos, oleaginosas, legumbres, cereales y pseudocereales que simulan la apariencia y consistencia de la leche de vaca pero con diferente biodisponibilidad y propiedades nutricionales (150). Algunas versiones industriales podrían estar fortificadas con calcio, pero en comparación con la leche, el perfil nutricional es generalmente bajo en proteínas, vitaminas (B2, D y E), minerales (calcio) y ácidos grasos saturados (excepto la bebida de coco); en cuanto a su contenido de carbohidratos, las bebidas vegetales muestran buenos niveles de calorías, en comparación a la leche entera (148).

En línea con los resultados de este estudio, los análisis que comprenden datos nutricionales sugieren que los niños con autismo tienen un consumo significativamente menor de calcio y vitamina D en comparación con sus pares con DT, teniendo malas consecuencias en la salud ósea y esquelética (151, 152). En un estudio transversal realizado en China que incluyó a 738 niños con TEA y 302 con desarrollo típico, se observó que los primeros consumían menos leche y productos lácteos que aquellos con DT (153). En la presente investigación, analizamos esta característica, también según el estado nutricional. Los niños con normopeso y TEA mostraron un menor consumo de leche + yogur y lácteos totales que los niños con el mismo estado nutricional y DT, lo cual fue influenciado principalmente por los niños con TEA que siguen una DSGC. Cabe destacar que la exclusión o un bajo

consumo de leche y productos lácteos podría resultar en una deficiencia de calcio, debido a una ingesta de este mineral por debajo de los niveles recomendados (154).

En cuanto al consumo de grasa, encontramos que el grupo TEA-dieta presentó una mayor ingesta de ghee y grasas totales que el grupo TEA-no dieta. Un mayor consumo de ghee podría deberse a que es un derivado lácteo (de la manteca) libre de caseína, por lo que se encuentra dentro de las opciones de una DSGC (155). Además, el ghee suele utilizarse en la cocina India y Pakistani, y como parte de tratamientos homeopáticos para la mejora de la memoria y del aprendizaje (156). Sin embargo, falta evidencia científica para apoyar estas afirmaciones. Asimismo, la ingesta de aceite de coco mostró una interacción significativa entre los factores estado nutricional y neurodesarrollo. Se vio una mayor ingesta de aceite de coco en niños con TEA y normopeso en comparación con niños con DT y el mismo estado nutricional. Esto podría explicarse porque el grupo TEA-dieta mostró un mayor consumo de aceite de coco. Su uso en dietas cetogénicas para el tratamiento de la epilepsia, podría ser una de las razones por la que los padres de niños que tienen TEA y realizan la DSGC lo consideran beneficioso para dicha comorbilidad (156, 157). No obstante, algunos ensayos controlados aleatorizados muestran que la ingesta de aceite de coco aumenta el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad y el colesterol total en comparación a otros aceites vegetales, por lo que la recomendación actual es incluirlo solamente dentro del 10% de la ingesta calórica total (127). Interesantemente, los niños del grupo DT con normopeso consumieron significativamente menos aceite de coco que el grupo con exceso de peso, lo que es concordante con varios estudios que demuestran un vínculo entre el consumo de ácidos grasos saturados y un aumento, en el número y tamaño, de los adipocitos (158).

En cuanto al estado nutricional, no encontramos diferencias significativas entre niños con TEA y DT. Sin embargo, en un metaanálisis de estudios epidemiológicos que analizaron la relación entre obesidad, sobrepeso y TEA, encontraron que la prevalencia de obesidad fue mayor en personas con TEA que en los controles (157). Según los autores, esto podría asociarse a trastornos alimentarios como la selectividad alimentaria y a un mayor tiempo

dedicado a actividades sedentaria. La discrepancia con los resultados del presente estudio podría deberse al pequeño tamaño de la muestra de la población que estudiamos.

Algunos estudios mencionan que los niños con TEA tienen fuertes preferencias alimentarias y alteraciones en el procesamiento sensorial (especialmente en la sensibilidad táctil, del gusto y del olfato) que pueden tener un impacto en la salud y el estado nutricional (44). Coincidentemente, al aplicar el cuestionario PSC encontramos que los participantes con TEA tenían un puntaje más bajo en “sensibilidad al gusto-olor” que el grupo con DT, demostrando una mayor sensibilidad en los niños con TEA. Este grupo también mostró una mayor sensibilidad táctil, falta de respuesta-búsqueda de sensaciones, filtrado auditivo, y perfil sensorial total. Un estudio que utilizó el mismo cuestionario con 281 niños con TEA, a quienes se los comparó con niños con DT de la misma edad, reportó resultados similares mostrando mayor sensibilidad en niños con autismo en los mismos aspectos (127).

La sensibilidad sensorial se ha sugerido como un posible mecanismo para explicar la selectividad en niños con TEA (136). Entre todos los niños (TEA y DT), los que presentaron DP + DD, tuvieron una ingesta media de queso menor que el grupo FT, y el factor perfil sensorial tuvo un efecto principal significativo en la ingesta de queso. En cuanto a esto, se observó que los niños con TEA y DP + DD (mayor sensibilidad) consumieron menos leche, yogur y productos lácteos totales, pero más cereales con y sin gluten y alimentos fuente de proteína, que los niños con TEA y FT. No se encontraron diferencias en el puntaje del perfil sensorial corto entre los participantes que hacen dieta y los que no, sin embargo, como se esperaba, el grupo TEA tenía mayor sensibilidad sensorial que el grupo DT. Esta sensibilidad se relacionó con un menor consumo de lácteos y una mayor ingesta de alimentos proteicos y cereales. No obstante, Zimmer et al. (151) describieron una ingesta más baja de proteínas en comensales selectivos con TEA. Es así que la selectividad podría tomarse como un factor influyente en el consumo de estos alimentos.

También encontramos un mayor consumo de alimentos no tradicionales en niños que siguen una DSGC (bebidas vegetales, ghee, aceite de coco). Por ello, es importante determinar su consumo y características, para evaluar la calidad de la dieta para un óptimo crecimiento y

desarrollo, y proporcionar un adecuado abordaje y seguimiento nutricional, teniendo en cuenta los factores que pueden afectar la ingesta dietética, como la sensibilidad sensorial. Es importante conocer las diferentes dietas que los niños y adolescentes con TEA siguen, para continuar estudiándolos y saber si cubren las ingestas nutricionales recomendadas, para que los profesionales de la salud puedan dar información científica al respecto. Este hallazgo acredita nuevamente la necesidad de personalizar las recomendaciones dietéticas para los desórdenes del espectro autista (127, 157).

Las limitaciones de este estudio fueron los problemas inherentes al uso del CFCA, ya que no es una herramienta específicamente diseñada para abordar el consumo de alimentos en niños con autismo. Los cuidadores suelen estimar las cantidades de alimentos consumidos en lugar de medirlos con precisión, por lo que los informes de los padres podrían estar sesgados hacia una dieta más saludable. Además, el tamaño de la muestra ha limitado los resultados del estudio. Sin embargo, hasta donde se conoce, no hay estudios previos que brinden información sobre el estado nutricional de estos niños, su ingesta de alimentos y su perfil sensorial en comparación con niños neurotípicos. Por lo tanto, creemos que este estudio puede ser una contribución importante para aumentar el conocimiento sobre estos temas.

## 6.5. Conclusiones

Para concluir, el presente estudio encontró diferencias en la ingesta de algunos grupos de alimentos entre niños con TEA y DT, según los criterios de agrupamiento de sensibilidad sensorial y estado nutricional. Como era de esperar, observamos una mayor sensibilidad en el grupo TEA en relación al grupo DT, mientras que el estado nutricional no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. Estos hallazgos también detallan una diferencia en la ingesta dietética entre los grupos TEA-dieta y TEA no dieta en el total de cereales con y sin gluten, lácteos, bebidas vegetales, ghee, aceite de coco y alimentos fuente de grasas, siendo mayor en el grupo TEA-dieta. Además, hubo una mayor ingesta de lácteos, cereales, pescado y manteca, y menor consumo de aceite de coco en niños con DT

que en niños con TEA. Es así que nuestros resultados nos proporcionaron un conocimiento más profundo del consumo de alimentos en esta población, que podría asociarse a las causas de los déficits nutricionales que se presentan en los niños con TEA. No obstante, se necesitan más investigaciones, con un tamaño muestral mayor, para continuar explorando las conexiones entre la ingesta de alimentos, el estado nutricional y la sensibilidad sensorial, conocer si se cumple con los requerimientos nutricionales y comprender sus causas, con el fin de que, cuando sean requeridas, se puedan llevar a cabo intervenciones que tengan implicaciones importantes para la salud en la niñez.

## 7. ESTUDIO 2

### COMPRENDIENDO LA RELACIÓN ENTRE LA MICROBIOTA INTESTINAL, LA INGESTA DIETÉTICA Y EL ESTADO NUTRICIONAL EN NIÑOS CON AUTISMO Y DESARROLLO TÍPICO

#### 7.1. Introducción

El TEA es una condición del neurodesarrollo que ha mostrado un rápido aumento de su prevalencia. Sin embargo, no existe ningún tratamiento estándar, dado que tiene una etología compleja que incluye factores genéticos y ambientales (159, 160). En las últimas décadas, se ha reconocido que la microbiota intestinal posee un papel importante en la salud humana y en distintas enfermedades como el autismo (105). Múltiples estudios de cohorte indican que varios trastornos relacionados con la inflamación y enfermedades del neurodesarrollo se han asociado a alteraciones del ecosistema intestinal, afección conocida como disbiosis (107, 108). Por ejemplo, se ha observado una abundancia relativa mayor de bacterias como *Clostridium* y *Sutterella* en los niños con TEA en comparación con los neurotípicos, pero aún existen controversias en los resultados de diferentes investigaciones (161).

Datos bibliográficos sólidos demuestran que hay una comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro en la que participan la microbiota, el sistema nervioso entérico, el sistema nervioso autónomo, el sistema endocrino, el sistema inmunológico y el sistema nervioso central (107). Se ha mostrado que los metabolitos bacterianos participan en la secreción de neurotransmisores que son parte de los procesos de memoria, aprendizaje y comportamiento (162). La dieta tiene un papel importante en la homeostasis de la microbiota intestinal, y los niños con TEA tienen dificultades para mantener una dieta balanceada debido a múltiples factores, como una gran selectividad alimentaria y problemas gastrointestinales (163). Por otra parte, muchas familias con niños con TEA deciden seguir una dieta sin gluten y caseína por la hipótesis, no demostrada, de que estas proteínas se metabolizan en gluteomorfina y caseomorfina y, a través de un intestino hiperpermeable, se

unen a receptores de opiáceos en el sistema nervioso central, provocando síntomas de autismo (147). Aún no existe consenso respecto del uso y la eficacia de este tipo de dieta para el tratamiento del autismo, y se necesitan estudios adicionales para describir los efectos de la dieta y la microbiota intestinal en los niños con y sin TEA (139, 147, 164).

La ingesta dietética puede configurar la microbiota intestinal a lo largo de toda la vida, y esto depende del tipo y la cantidad de alimentos, que pueden modular hasta el 60% de la estructura del microbioma, dado que proveen innumerables sustratos para el metabolismo microbiano (165, 166). Además, existen bacterias con enzimas específicas que convierten ciertos nutrientes en diferentes metabolitos que influyen en la función cerebral (167). Por ejemplo, a partir del metabolismo del triptófano, es posible obtener indol, el cual tiene un efecto positivo en la salud mental, pero otro metabolito como el sulfato de indoxilo ha sido relacionado con el desarrollo del TEA.

En relación con la ingesta de alimentos y su asociación con la taxonomía bacteriana, un estudio realizado en niños europeos (alimentados con una dieta occidental rica en proteínas de origen animal) y africanos (alimentados con vegetales locales y granos enteros) comparó sus microbiotas intestinales y reveló que aquellos de Burkina Faso tienen niveles más altos de *Prevotella* y menores de *Bacteroides* y *Enterobacteriaceae* en comparación con los provenientes de Italia (168). Esta dieta y la microbiota intestinal en los niños del África rural se han relacionado con menos trastornos inflamatorios y enfermedades infecciosas del colon (139, 168). Por otro lado, se ha demostrado que las dietas con alta ingesta de carnes rojas, carbohidratos refinados y grasa, y menor consumo de pescado y vegetales podrían causar disbiosis (166).

Asimismo, la evidencia científica ha demostrado que el estado nutricional está relacionado con la microbiota intestinal (169). Existe falta de consenso respecto de la composición taxonómica saludable del microbioma, pero estudios recientes muestran que hay diferencias entre las bacterias intestinales de los niños y adolescentes delgados y con obesidad (170). Bervoets et al. (171) observaron que los niños con obesidad tenían niveles más altos de

*Lactobacillus* spp. y más bajos de *Bifidobacterium vulgatus* que los más delgados. Un estudio prospectivo mostró que la obesidad en niños estaba asociada a un aumento de *Bacteroidaceae* y una abundancia relativa menor de *Prevotellaceae* en comparación con sus pares con normopeso (169). La relación entre las bacterias intestinales y el aumento de peso corporal aún no está clara (165).

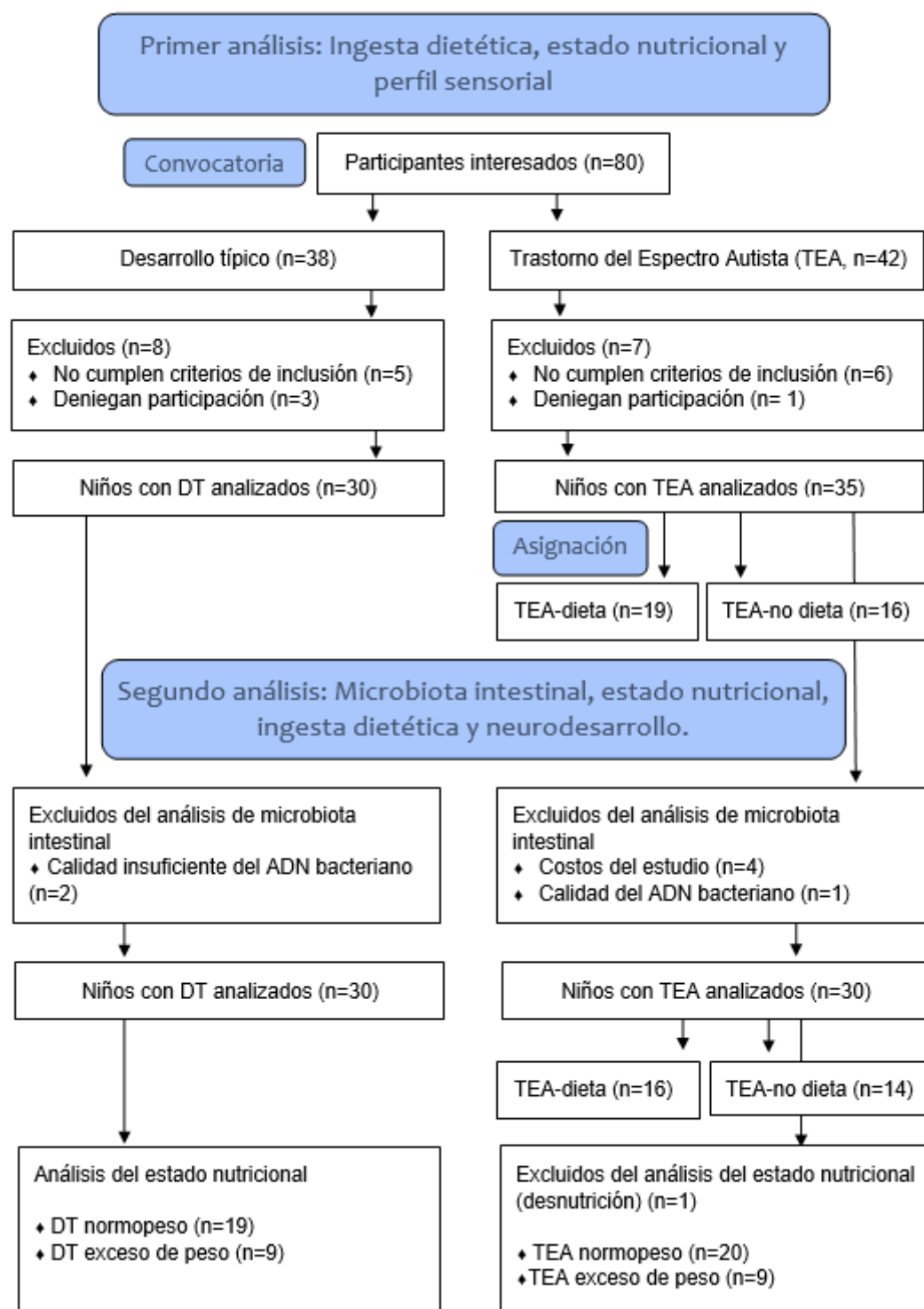
Se ha observado que, tanto en las personas con TEA como en las neurotípicas, una intervención temprana en la microbiota intestinal de los niños puede contribuir a prevenir trastornos de salud, pero es necesario conocer el vínculo entre la dieta y la composición microbiana intestinal con el fin de definir una estrategia para mejorar la salud de los niños (172, 173). Los síntomas y las comorbilidades del TEA podrían mejorar mediante intervenciones dietéticas llevadas a cabo después de comprender más profundamente cómo los alimentos se relacionan con la microbiota intestinal (167). El propósito del presente estudio fue analizar la composición bacteriana intestinal en niños con TEA y con desarrollo típico (DT) y su relación con el estado nutricional y la ingesta dietética.

## 7.2. Materiales y métodos

### 7.2.1. Participantes y declaraciones éticas

Entre los meses de febrero y marzo de 2020, reclutamos a un total de 65 niños y adolescentes de 3 a 12 años, por medio de una convocatoria abierta, en un consultorio de nutrición en Montevideo, Uruguay (163); en este estudio de la microbiota intestinal fueron incluidos 30 con TEA y 28 neurotípicos (**Figura 7**). El diagnóstico de TEA fue realizado por parte de un psiquiatra o un especialista en neurología pediátrica, cumpliendo con los criterios del Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales (140). Los participantes no recibieron medicamentos, antibióticos ni probióticos desde, por lo menos, un mes antes de comenzar el estudio y ningún niño del grupo DT seguía una dieta restrictiva. Además, aquellos diagnosticados con trastorno por déficit de atención e hiperactividad, diabetes mellitus, enfermedades genéticas, errores congénitos del metabolismo, enfermedad inflamatoria intestinal, celiaquía y alteraciones motoras, fueron

excluidos de ambos grupos. Esta investigación se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki 2000, siendo aprobada por el Comité de Ética en Investigación de la Escuela de Nutrición, Universidad de la República, y registrada en el Ministerio de Salud de Uruguay (No. 282599). El estudio se explicó a los padres de los participantes por teléfono y se discutió personalmente en la primera visita a la clínica de investigación, donde se obtuvo por escrito el consentimiento informado de los padres de todos los niños y adolescentes.



**Figura 7.** Diagrama de flujo de los participantes del estudio.

### 7.2.2. Recolección de muestras, secuenciación de la microbiota intestinal y clasificación taxonómica

Los padres de los niños recibieron un kit de toma de muestra de microbiota fecal (tubo con medios de transporte e hisopo para la recolección de la muestra), e instrucciones minuciosas para recoger las muestras de heces de sus hijos en el hogar. Los padres obtuvieron una sola muestra fecal que mantuvieron refrigerada hasta la entrega en la clínica, durante un lapso no mayor a 48 horas. Una vez recibidas, las muestras fueron transferidas al laboratorio con un envoltorio refrigerante y almacenadas en un ultrafreezer a -80°C hasta su análisis.

La extracción del ADN bacteriano se realizó en el laboratorio de Enteria SRL, que siguió el protocolo recomendado por Quick – DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research - Catalog No. D6010). La cantidad y la calidad del ADN se evaluó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, usando el equipo Tecan Infinite M200 Pro (rango de absorbancia 1.8 - 2 OD<sub>280/260</sub>). El ADN genómico extraído se envió al laboratorio Genia, para amplificar las regiones hipervariables V1-V9 del gen ADNr 16S de las bacterias con Ion 16S™ Metagenomics Kit en un termociclador, utilizando el flujo de trabajo de secuenciación con semiconductores de Ion Torrent™. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados utilizando el Ion PGM™ Sequencing 400 Kit en la plataforma Ion PGM™ y analizados usando el módulo de análisis de metagenómica Ion 16S™ del software Ion Reporter™.

Las muestras de heces se estudiaron para determinar los tipos y la abundancia relativa de la microbiota intestinal. Las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) se definieron con un 97% de homología de secuencias, y se normalizaron las abundancias de estos géneros y especies bacterianas. La clasificación taxonómica se realizó usando la base de datos de referencia SILVA 128, hasta el nivel de especies.

### 7.2.3. Medidas antropométricas e ingesta dietética

Los protocolos utilizados para la recolección de datos, incluidos los de medidas antropométricas y de ingesta dietética, se describieron anteriormente por Mendive Dubourdieu et al. (163). La misma investigadora nutricionista midió la talla y el peso de cada participante. La altura se obtuvo utilizando un tallímetro portátil (208 Seca) con un rango de 810 a 2060 mm y una precisión de 1 mm, y el peso se midió empleando una balanza electrónica portátil (Seca 813, Hamburgo, Alemania) con una precisión de 100 gr, asegurándose que los niños estuvieran con ropa liviana y descalzos de acuerdo con las técnicas estandarizadas de Frisancho (142) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (141, 142). Los datos se analizaron con el software Anthro (para niños de 3 a 5 años) y Anthro plus (para niños y adolescentes de 5 a 12 años) (OMS v.1.0.2. 2007), que aplican las curvas de crecimiento infantil de la OMS (142). El índice de masa corporal para la edad (IMC/E), expresado en puntaje z, fue el indicador estudiado para clasificar a los niños en una de las siguientes categorías: normopeso y exceso de peso (riesgo de sobrepeso + sobrepeso + obesidad). Los puntos de corte utilizados para los niños de 2 a 5 años fueron:  $>3SD$ , obesidad;  $>2SD$ , sobrepeso;  $>1SD$ , riesgo de sobrepeso; entre  $<1SD$  y  $>-1SD$ , peso normal;  $\leq -1SD$ , riesgo de desnutrición;  $\leq -2SD$ , emaciación;  $\leq -3SD$ , emaciación grave. En aquellos mayores de 5 años:  $\geq 2SD$ , obesidad;  $\geq 1SD$ , sobrepeso; entre  $<1SD$  y  $>-2SD$ , peso normal;  $\leq -2SD$ , desnutrición,  $\leq -3SD$ ; emaciación grave. Los niños y adolescentes que presentaron desnutrición, riesgo de desnutrición, emaciación o emaciación grave se descartaron porque el tamaño de la muestra era pequeño ( $n=2$ ) y, por lo tanto, esos participantes no fueron considerados para el análisis antropométrico.

Los niños con TEA fueron divididos en dos grupos según siguieran una dieta libre de gluten y caseína (TEA-dieta,  $n=16$ ) o no siguieran una dieta restrictiva (TEA-no dieta,  $n=14$ ). La ingesta alimentaria de los últimos 3 meses se calculó a partir de los datos obtenidos a través del cuestionario de frecuencia de alimentos (CFCA) del estudio SAYCARE (143), que se adaptó a este estudio con el fin de recoger información sobre el consumo de alimentos sin gluten y sin caseína. A los padres de los niños se les pidió que indicaran la frecuencia de

consumo de cada alimento y el tamaño de la porción con un cuadernillo con fotos de alimentos como referencia. Se calculó el consumo promedio diario de cada alimento (gr/día o ml/día) y se lo organizó en diferentes grupos, de la siguiente manera: 1) “lácteos”: leche, yogurt, leche chocolatada, postres lácteos y queso; 2) “bebidas vegetales”: bebidas de alpiste, castañas, almendras, avena, arroz y coco; 3) “cereales con gluten”: pastas, pan, galletitas, productos de panadería, cereales de desayuno, pizza y empanadas, “cereales sin gluten”: los mismos alimentos del grupo anterior sin gluten, y arroz; 4) “alimentos fuente de proteínas”: carne, carne picada, pollo, cerdo, huevos, pescado fresco y enlatado, y milanesas con y sin gluten (para la que se atribuyó un 25% de su peso al cereal); 5) “alimentos fuente de grasa”: manteca, ghee (grasa que se obtiene calentando manteca de leche de vaca) y aceites. Los lácteos, cereales con gluten, cereales sin gluten, alimentos fuente de grasa (para los niños con desarrollo típico y TEA sin dieta), y bebidas vegetales, cereales sin gluten, alimentos fuente de proteínas (para los niños con TEA y DSGC) fueron divididos en dos subgrupos, considerando el percentil 50 de las ingestas (ingestas  $\leq$  p50 y  $>$ p50).

#### 7.2.4. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos, se usó el programa IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Para verificar la distribución normal de las variables aplicamos el test Kolmogorov-Smirnov. Los datos que no tenían una distribución normal fueron transformados con log10. Se aceptó como significativo un valor p inferior a 0,05 (dos colas).

Para comparar la abundancia relativa de los géneros y las especies de acuerdo con el neurodesarrollo (TEA vs DT) y entre los niños con autismo (TEA-dieta vs TEA-no dieta), se realizó una prueba t para muestras independientes. Para estudiar la abundancia relativa de las bacterias en función del estado nutricional (NP y EP) en niños con TEA y DT, se utilizó ANCOVA de dos vías (ajustando por edad, peso al nacer y DSGC/dieta no restrictiva). Las comparaciones por pares entre los diferentes grupos se ajustaron con la prueba post hoc de Bonferroni. La comparación entre NP y EP en todos los niños (TEA + DT) se realizó

utilizando ANCOVA de una vía y corrigiendo por los mismos factores de confusión potenciales.

Las asociaciones entre la microbiota intestinal y la ingesta dietética, se evaluaron usando regresión lineal univariada, que se ajustó por los siguientes factores de confusión potenciales: edad, DSGC/dieta no restrictiva, y neurodesarrollo DT/TEA (en el grupo Todos); edad (en el grupo DT); y edad y DSGC/dieta no restrictiva (en el grupo TEA). Las diferencias de abundancia bacteriana entre los grupos p50 de ingesta alimentaria, en niños con DT y TEA-no dieta, se analizaron utilizando ANOVA de dos vías. Finalmente, se utilizaron las pruebas t de Student y Mann-Whitney para determinar si había diferencias en las abundancias relativas de bacterias intestinales entre aquellos que tenían una ingesta mayor o menor de lácteos en el grupo TEA-dieta.

### 7.3. Resultados

Las características antropométricas, la ingesta dietética y la edad de los niños con trastorno del espectro autista y con desarrollo típico se publicaron con anterioridad (163). En la **Tabla 5**, comparamos las medias de las abundancias relativas de 20 géneros y 16 especies de las bacterias seleccionadas, de acuerdo con los grupos TEA-dieta vs TEA-no dieta y TEA vs DT. No se encontró diferencias significativas en las abundancias relativas de géneros entre los niños neurotípicos y aquellos con TEA. Sin embargo, hubo una diferencia significativa en la media de abundancia relativa de *Bifidobacterium* ( $p=0,008$ ), *Roseburia* ( $p=0,002$ ) y *Sutterella* ( $p=0,015$ ) entre los grupos TEA-dieta y TEA-no dieta. A nivel de las especies, el grupo TEA-dieta mostró menos *Bifidobacterium adolescentis* ( $p=0,046$ ) y *Bifidobacterium longum* ( $p=0,002$ ), pero más *Roseburia hominis* ( $p=0,002$ ) que el grupo TEA-no dieta. Además, el grupo TEA tenía menos *Bifidobacterium longum* ( $p=0,002$ ) y más *Clostridium glycolicum* ( $p=0,028$ ) que los niños con DT.

**Tabla 5.** Abundancia relativa de géneros y especies de bacterias intestinales en niños con trastorno del espectro autista y con desarrollo típico.

| Bacterias intestinales              | Grupo TEA        |                     |                          | Grupo TEA (n=30) | Grupo DT (n=28) | p**                      |
|-------------------------------------|------------------|---------------------|--------------------------|------------------|-----------------|--------------------------|
|                                     | TEA-dieta (n=16) | TEA-no dieta (n=14) | p*                       |                  |                 |                          |
| Géneros                             |                  |                     |                          |                  |                 |                          |
| <i>Akkermansia</i>                  | 1,39 ± 1,90      | 1,84 ± 2,74         | 0,618 <sup>1</sup>       | 1,60 ± 2,30      | 1,45 ± 2,17     | 0,938 <sup>1</sup>       |
| <i>Alistipes</i>                    | 3,61 ± 2,82      | 4,42 ± 3,61         | 0,494 <sup>2</sup>       | 3,98 ± 3,18      | 4,30 ± 2,92     | 0,565 <sup>2</sup>       |
| <i>Bacteroides</i>                  | 23,98 ± 11,66    | 21,36 ± 7,82        | 0,482 <sup>2</sup>       | 22,75 ± 9,98     | 24,45 ± 10,14   | 0,554 <sup>2</sup>       |
| <i>Bifidobacterium</i>              | 1,44 ± 1,80      | 4,22 ± 3,62         | <b>0,008<sup>1</sup></b> | 2,73 ± 3,09      | 3,53 ± 2,35     | 0,054 <sup>1</sup>       |
| <i>Blautia</i>                      | 2,84 ± 1,11      | 2,34 ± 1,18         | 0,114 <sup>1</sup>       | 2,60 ± 1,15      | 2,65 ± 1,23     | 0,803 <sup>1</sup>       |
| <i>Clostridium</i>                  | 6,47 ± 3,16      | 7,60 ± 3,65         | 0,280 <sup>1</sup>       | 6,99 ± 3,39      | 6,90 ± 3,35     | 0,901 <sup>1</sup>       |
| <i>Coprococcus</i>                  | 0,85 ± 0,84      | 0,63 ± 0,48         | 0,760 <sup>1</sup>       | 0,74 ± 0,63      | 0,77 ± 0,69     | 0,962 <sup>1</sup>       |
| <i>Dialister</i>                    | 0,60 ± 1,10      | 1,36 ± 1,65         | 0,105 <sup>1</sup>       | 0,94 ± 1,40      | 0,67 ± 0,78     | 0,871 <sup>1</sup>       |
| <i>Enterococcus</i>                 | 0,56 ± 2,03      | 0,10 ± 0,10         | 0,427 <sup>1</sup>       | 0,34 ± 1,48      | 0,33 ± 0,83     | 0,122 <sup>1</sup>       |
| <i>Eubacterium</i>                  | 3,66 ± 2,38      | 2,54 ± 1,54         | 0,114 <sup>1</sup>       | 3,13 ± 2,08      | 3,07 ± 2,05     | 0,988 <sup>1</sup>       |
| <i>Faecalibacterium</i>             | 16,34 ± 7,68     | 11,72 ± 4,62        | 0,060 <sup>2</sup>       | 14,18 ± 6,75     | 15,13 ± 5,09    | 0,312 <sup>2</sup>       |
| <i>Lachnoclostridium</i>            | 1,18 ± 0,81      | 0,96 ± 1,09         | 0,561 <sup>1</sup>       | 1,07 ± 0,96      | 0,82 ± 0,71     | 0,586 <sup>1</sup>       |
| <i>Lactobacillus</i>                | 0,64 ± 0,65      | 1,03 ± 2,28         | 0,786 <sup>1</sup>       | 0,82 ± 1,61      | 0,67 ± 1,26     | 0,697 <sup>1</sup>       |
| <i>Prevotella</i>                   | 12,93 ± 12,52    | 10,87 ± 11,72       | 0,739 <sup>1</sup>       | 11,96 ± 11,99    | 6,89 ± 9,16     | 0,093 <sup>1</sup>       |
| <i>Pseudomonas</i>                  | 0,65 ± 2,46      | 0,05 ± 0,05         | 0,683 <sup>1</sup>       | 0,37 ± 1,79      | 0,06 ± 0,06     | 0,534 <sup>1</sup>       |
| <i>Roseburia</i>                    | 3,47 ± 1,98      | 1,32 ± 0,99         | <b>0,002<sup>1</sup></b> | 2,47 ± 1,92      | 2,89 ± 1,92     | 0,304 <sup>1</sup>       |
| <i>Ruminococcus</i>                 | 2,55 ± 1,72      | 2,54 ± 1,23         | 0,618 <sup>1</sup>       | 2,55 ± 1,48      | 2,81 ± 1,34     | 0,350 <sup>1</sup>       |
| <i>Streptococcus</i>                | 0,49 ± 0,33      | 2,27 ± 5,60         | 0,394 <sup>1</sup>       | 1,32 ± 3,86      | 1,53 ± 1,71     | 0,058 <sup>1</sup>       |
| <i>Sutterella</i>                   | 0,62 ± 1,22      | 2,13 ± 1,98         | <b>0,015<sup>1</sup></b> | 1,32 ± 1,77      | 1,78 ± 1,76     | 0,119 <sup>1</sup>       |
| <i>Turicibacter</i>                 | 0,80 ± 1,21      | 0,62 ± 0,65         | 0,868 <sup>1</sup>       | 0,72 ± 0,98      | 0,56 ± 0,60     | 0,749 <sup>1</sup>       |
| Especies                            |                  |                     |                          |                  |                 |                          |
| <i>Akkermansia muciniphila</i>      | 1,19 ± 1,40      | 2,27 ± 3,30         | 0,269 <sup>1</sup>       | 1,69 ± 2,49      | 1,75 ± 2,60     | 0,935 <sup>1</sup>       |
| <i>Bacteroides fragilis</i>         | 0,45 ± 0,47      | 1,21 ± 2,85         | 0,301 <sup>1</sup>       | 0,80 ± 1,97      | 1,21 ± 1,32     | 0,075 <sup>1</sup>       |
| <i>Bacteroides intestinalis</i>     | 0,02 ± 0,03      | 0,13 ± 0,33         | 0,944 <sup>1</sup>       | 0,07 ± 0,23      | 0,55 ± 2,43     | 0,453 <sup>1</sup>       |
| <i>Bifidobacterium adolescentes</i> | 0,30 ± 0,47      | 1,25 ± 2,10         | <b>0,046<sup>1</sup></b> | 0,74 ± 1,52      | 0,65 ± 1,12     | 0,463 <sup>1</sup>       |
| <i>Bifidobacterium longum</i>       | 0,23 ± 0,49      | 1,11 ± 2,67         | <b>0,002<sup>1</sup></b> | 0,64 ± 1,87      | 1,21 ± 1,80     | <b>0,002<sup>1</sup></b> |
| <i>Clostridium bartlettii</i>       | 0,42 ± 0,39      | 0,63 ± 0,63         | 0,647 <sup>1</sup>       | 0,52 ± 0,09      | 0,22 ± 0,04     | 0,335 <sup>1</sup>       |
| <i>Clostriduim glycolicum</i>       | 0,42 ± 0,28      | 0,55 ± 0,49         | 0,678 <sup>1</sup>       | 0,48 ± 0,39      | 0,31 ± 0,30     | <b>0,028<sup>1</sup></b> |
| <i>Coprococcus comes</i>            | 0,19 ± 0,20      | 0,37 ± 0,36         | 0,156 <sup>1</sup>       | 0,28 ± 0,29      | 0,27 ± 0,25     | 0,767 <sup>1</sup>       |
| <i>Eubacterium eligens</i>          | 1,76 ± 1,83      | 1,48 ± 1,53         | 0,561 <sup>1</sup>       | 1,68 ± 0,30      | 1,01 ± 1,01     | 0,171 <sup>1</sup>       |
| <i>Eubacterium ventriosum</i>       | 10,77 ± 9,20     | 8,60 ± 8,14         | 0,618 <sup>1</sup>       | 9,76 ± 8,64      | 12,58 ± 8,89    | 0,101 <sup>1</sup>       |
| <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | 6,60 ± 11,80     | 3,95 ± 5,60         | 0,982 <sup>1</sup>       | 5,36 ± 9,37      | 3,99 ± 7,69     | 0,735 <sup>1</sup>       |
| <i>Flavonifactor plautii</i>        | 0,95 ± 2,00      | 0,76 ± 1,03         | 0,802 <sup>1</sup>       | 0,86 ± 1,60      | 0,89 ± 0,89     | 0,111 <sup>1</sup>       |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>        | 0,29 ± 0,44      | 0,18 ± 0,42         | 0,498 <sup>1</sup>       | 0,24 ± 0,43      | 0,30 ± 0,41     | 0,350 <sup>1</sup>       |
| <i>Lactobacillus salivarius</i>     | 0,04 ± 0,07      | 0,52 ± 1,71         | 0,386 <sup>1</sup>       | 0,27 ± 1,17      | 0,03 ± 0,08     | 0,182 <sup>1</sup>       |
| <i>Roseburia</i>                    | 0,37 ± 0,40      | 0,10 ± 0,17         | <b>0,002<sup>1</sup></b> | 0,24 ± 0,34      | 0,49 ± 1,37     | 0,331 <sup>1</sup>       |

|                                       |             |             |                    |             |             |                    |
|---------------------------------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|--------------------|
| <i>hominis</i>                        |             |             |                    |             |             |                    |
| <i>Trabulsiella<br/>odonototermis</i> | 0,63 ± 1,33 | 0,34 ± 0,55 | 0,483 <sup>1</sup> | 0,49 ± 1,03 | 0,50 ± 0,65 | 0,366 <sup>1</sup> |

Los resultados fueron expresados como media ± DE. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita):  $p < 0,05$  (<sup>1</sup> prueba Mann–Whitney, <sup>2</sup> prueba t para muestras independientes); comparación entre \* TEA-dieta y TEA-no dieta, \*\* grupo TEA y grupo DT. TEA: Trastorno del espectro autista; TEA-dieta: niños con TEA y con una ingesta dietética sin gluten ni caseína; TEA-no dieta: niños con TEA sin una dieta restrictiva; DT: desarrollo típico.

En la **Tabla 6**, se compararon las abundancias relativas de géneros y especies entre los grupos de estado nutricional (normopeso vs exceso de peso) y de neurodesarrollo (TEA vs DT) por medio de ANCOVA de dos vías. Los niños del grupo Todos (TEA + DT), con exceso de peso, tenían menor abundancia relativa de *Roseburia* que los de normopeso ( $p=0,012$ ). Además, los que presentaban exceso de peso del grupo TEA mostraron una menor abundancia relativa de *Roseburia* ( $p=0,005$ ) y *Faecalibacterium prausnitzii* ( $p=0,038$ ), y mayor de *Eubacterium ventriosum* ( $p=0,019$ ) y *Flavonifactor plautii* ( $p=0,043$ ) que aquellos del grupo DT con exceso de peso.

**Tabla 6.** Comparación de los géneros y especies de bacterias intestinales entre los grupos de estado nutricional (normopeso vs exceso de peso) y de neurodesarrollo (trastorno del espectro autista vs desarrollo típico) por medio de ANCOVA de dos vías.

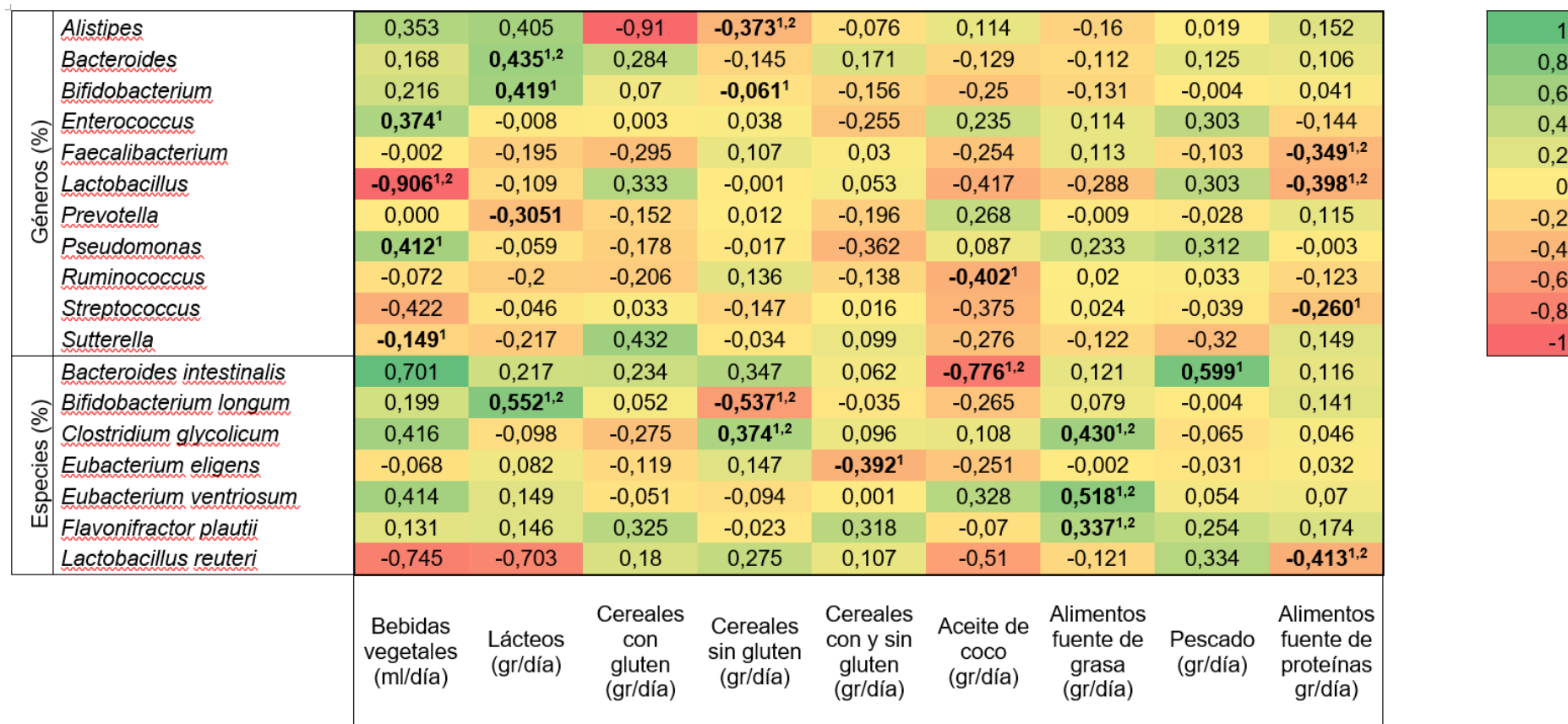
| Bacterias intestinales              | Grupo TEA        |                                | Grupo DT         |                                | Todos            |                                 | Comparaciones por pares |                |                |                |                |
|-------------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Géneros                             | Normopeso (n=20) | Exceso de peso (SP + OB) (n=9) | Normopeso (n=19) | Exceso de peso (SP + OB) (n=9) | Normopeso (n=39) | Exceso de peso (SP + OB) (n=18) | P <sup>1</sup>          | P <sup>2</sup> | P <sup>3</sup> | P <sup>4</sup> | P <sup>5</sup> |
| <i>Akkermansia</i>                  | 1,12 ± 1,76      | 2,52 ± 3,17                    | 1,73 ± 2,54      | 0,86 ± 0,90                    | 1,42 ± 2,17      | 1,69 ± 2,42                     | 0,282                   | 0,812          | 0,518          | 0,956          | 0,295          |
| <i>Alistipes</i>                    | 3,69 ± 2,85      | 4,35 ± 4,03                    | 4,84 ± 3,12      | 3,16 ± 2,17                    | 4,25 ± 3,00      | 3,76 ± 3,20                     | 0,215                   | 0,172          | 0,997          | 0,905          | 0,051          |
| <i>Bacteroides</i>                  | 21,71 ± 10,19    | 24,86 ± 10,30                  | 25,72 ± 10,75    | 21,78 ± 8,68                   | 23,66 ± 10,52    | 23,32 ± 9,38                    | 0,325                   | 0,369          | 0,902          | 0,14           | 0,697          |
| <i>Bifidobacterium</i>              | 2,36 ± 2,59      | 3,71 ± 4,13                    | 3,73 ± 2,63      | 3,11 ± 1,66                    | 3,03 ± 2,67      | 3,41 ± 3,07                     | 0,565                   | 0,986          | 0,655          | 0,668          | 0,871          |
| <i>Blautia</i>                      | 2,62 ± 1,36      | 2,40 ± 0,31                    | 2,86 ± 1,42      | 2,21 ± 0,54                    | 2,74 ± 1,37      | 2,30 ± 0,44                     | 0,892                   | 0,406          | 0,646          | 0,209          | 0,841          |
| <i>Clostridium</i>                  | 7,21 ± 3,68      | 6,29 ± 2,88                    | 7,22 ± 2,99      | 6,22 ± 4,11                    | 7,22 ± 3,32      | 6,25 ± 3,44                     | 0,287                   | 0,275          | 0,131          | 0,671          | 0,798          |
| <i>Coprococcus</i>                  | 0,88 ± 0,67      | 0,52 ± 0,49                    | 0,76 ± 0,72      | 0,79 ± 0,65                    | 0,82 ± 0,69      | 0,66 ± 0,58                     | 0,188                   | 0,509          | 0,585          | 0,645          | 0,211          |
| <i>Dialister</i>                    | 0,90 ± 1,49      | 1,01 ± 1,36                    | 0,63 ± 0,72      | 0,77 ± 0,95                    | 0,76 ± 1,16      | 0,89 ± 1,14                     | 0,205                   | 0,438          | 0,549          | 0,571          | 0,141          |
| <i>Enterococcus</i>                 | 0,46 ± 1,81      | 0,10 ± 0,12                    | 0,43 ± 0,99      | 0,10 ± 0,13                    | 0,45 ± 1,45      | 0,10 ± 0,12                     | 0,927                   | 0,235          | 0,462          | 0,251          | 0,901          |
| <i>Eubacterium</i>                  | 3,47 ± 2,32      | 2,49 ± 1,41                    | 2,99 ± 1,89      | 3,24 ± 2,47                    | 3,24 ± 2,10      | 2,87 ± 1,99                     | 0,526                   | 0,882          | 0,712          | 0,625          | 0,318          |
| <i>Faecalibacterium</i>             | 14,84 ± 7,58     | 12,11 ± 4,38                   | 15,14 ± 5,27     | 15,11 ± 5,01                   | 14,99 ± 6,48     | 13,61 ± 4,82                    | 0,596                   | 0,983          | 0,706          | 0,26           | 0,197          |
| <i>Lachnoclostridium</i>            | 0,86 ± 0,84      | 1,53 ± 1,15                    | 0,83 ± 0,79      | 0,80 ± 0,52                    | 0,84 ± 0,81      | 1,17 ± 0,94                     | 0,192                   | 0,913          | 0,371          | 0,42           | 0,567          |
| <i>Lactobacillus</i>                | 0,94 ± 1,94      | 0,60 ± 0,58                    | 0,46 ± 0,59      | 1,10 ± 2,07                    | 0,71 ± 1,45      | 0,85 ± 1,50                     | 0,456                   | 0,461          | 0,928          | 0,172          | 0,913          |
| <i>Prevotella</i>                   | 11,52 ± 12,36    | 14,11 ± 11,79                  | 6,67 ± 10,05     | 7,36 ± 7,45                    | 9,16 ± 11,41     | 10,74 ± 10,18                   | 0,402                   | 0,505          | 0,287          | 0,372          | 0,392          |
| <i>Pseudomonas</i>                  | 0,52 ± 2,20      | 0,07 ± 0,04                    | 0,07 ± 0,06      | 0,04 ± 0,03                    | 0,30 ± 1,57      | 0,06 ± 0,04                     | 0,658                   | 0,367          | 0,353          | 0,654          | 0,924          |
| <i>Roseburia</i>                    | 2,73 ± 2,21      | 1,99 ± 1,09                    | 2,82 ± 2,05      | 3,03 ± 1,69                    | 2,77 ± 2,11      | 2,51 ± 1,48                     | 0,965                   | 0,56           | 0,671          | <b>0,005</b>   | <b>0,012</b>   |
| <i>Ruminococcus</i>                 | 2,37 ± 1,44      | 2,87 ± 1,68                    | 3,01 ± 1,46      | 2,38 ± 1,00                    | 2,68 ± 1,47      | 2,62 ± 1,36                     | 0,55                    | 0,434          | 0,932          | 0,193          | 0,912          |
| <i>Streptococcus</i>                | 1,56 ± 4,72      | 0,83 ± 0,90                    | 1,76 ± 1,94      | 1,04 ± 1,00                    | 1,66 ± 3,60      | 0,94 ± 0,93                     | 0,773                   | 0,831          | 0,721          | 0,708          | 0,709          |
| <i>Sutterella</i>                   | 1,27 ± 1,48      | 1,57 ± 2,41                    | 1,37 ± 1,61      | 2,66 ± 1,84                    | 1,32 ± 1,53      | 2,12 ± 2,15                     | 0,732                   | 0,306          | 0,75           | 0,333          | 0,745          |
| <i>Turicibacter</i>                 | 0,81 ± 1,09      | 0,51 ± 0,74                    | 0,61 ± 0,66      | 0,44 ± 0,46                    | 0,71 ± 0,90      | 0,48 ± 0,60                     | 0,593                   | 0,799          | 0,568          | 0,422          | 0,750          |
| Especies                            |                  |                                |                  |                                |                  |                                 |                         |                |                |                |                |
| <i>Akkermansia muciniphila</i>      | 0,97 ± 1,30      | 3,08 ± 3,82                    | 2,09 ± 3,02      | 1,03 ± 1,14                    | 1,51 ± 2,34      | 2,06 ± 2,93                     | 0,184                   | 0,619          | 0,517          | 0,634          | 0,261          |
| <i>Bacteroides fragilis</i>         | 0,96 ± 2,38      | 0,45 ± 0,64                    | 1,37 ± 1,48      | 0,86 ± 0,85                    | 1,16 ± 1,98      | 0,65 ± 0,76                     | 0,804                   | 0,727          | 0,681          | 0,53           | 0,646          |
| <i>Bacteroides intestinalis</i>     | 0,02 ± 0,02      | 0,19 ± 0,41                    | 0,80 ± 2,94      | 0,03 ± 0,03                    | 0,34 ± 0,28      | 0,26 ± 0,42                     | 0,435                   | 0,274          | 0,421          | 0,381          | 0,872          |
| <i>Bifidobacterium adolescentes</i> | 0,64 ± 1,15      | 1,07 ± 2,25                    | 0,54 ± 1,21      | 0,89 ± 0,90                    | 0,59 ± 1,16      | 0,98 ± 1,66                     | 0,612                   | 0,719          | 0,545          | 0,575          | 0,539          |
| <i>Bifidobacterium</i>              | 0,32 ± 0,45      | 1,34 ± 3,39                    | 1,45 ± 2,13      | 0,71 ± 0,52                    | 0,87 ± 1,60      | 1,02 ± 2,37                     | 0,64                    | 0,574          | 0,473          | 0,222          | 0,35           |

|                                     |              |              |              |              |              |              |       |       |       |              |       |
|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|--------------|-------|
| <i>longum</i>                       |              |              |              |              |              |              |       |       |       |              |       |
| <i>Clostridium bartletti</i>        | 0,50 ± 0,57  | 0,56 ± 0,46  | 0,34 ± 0,26  | 0,26 ± 0,10  | 0,42 ± 0,44  | 0,411 ± 0,35 | 0,641 | 0,793 | 0,867 | 0,696        | 0,382 |
| <i>Clostridium glycolicum</i>       | 0,42 ± 0,34  | 0,63 ± 0,49  | 0,33 ± 0,34  | 0,26 ± 0,22  | 0,38 ± 0,34  | 0,45 ± 0,41  | 0,546 | 0,748 | 0,817 | 0,319        | 0,14  |
| <i>Coprococcus comes</i>            | 0,33 ± 0,33  | 0,18 ± 0,18  | 0,28 ± 0,28  | 0,27 ± 0,19  | 0,311 ± 0,30 | 0,22 ± 0,19  | 0,511 | 0,786 | 0,496 | 0,304        | 0,699 |
| <i>Eubacterium eligens</i>          | 1,76 ± 1,93  | 1,47 ± 1,06  | 1,09 ± 1,13  | 0,86 ± 0,70  | 1,43 ± 1,61  | 1,17 ± 0,93  | 0,41  | 0,658 | 0,755 | 0,78         | 0,418 |
| <i>Eubacterium ventriosum</i>       | 7,91 ± 9,51  | 12,74 ± 4,95 | 13,60 ± 9,06 | 10,42 ± 8,61 | 10,68 ± 9,61 | 11,58 ± 6,92 | 0,064 | 0,415 | 0,414 | <b>0,019</b> | 0,719 |
| <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | 7,98 ± 10,60 | 0,13 ± 0,34  | 3,07 ± 6,55  | 5,93 ± 9,38  | 5,59 ± 9,10  | 3,03 ± 7,38  | 0,294 | 0,994 | 0,395 | <b>0,038</b> | 0,774 |
| <i>Flavonifactor plautii</i>        | 0,32 ± 0,49  | 1,26 ± 1,18  | 0,89 ± 0,79  | 0,89 ± 1,14  | 0,60 ± 0,70  | 1,07 ± 1,14  | 0,223 | 0,295 | 0,846 | <b>0,043</b> | 0,915 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>        | 0,11 ± 0,27  | 0,50 ± 0,59  | 0,30 ± 0,45  | 0,30 ± 0,35  | 0,20 ± 0,38  | 0,40 ± 0,48  | 0,696 | 0,773 | 0,624 | 0,464        | 0,502 |
| <i>Lactobacillus salivarius</i>     | 0,39 ± 1,43  | 0,01 ± 0,04  | 0,02 ± 0,79  | 0,06 ± 0,09  | 0,21 ± 1,03  | 0,03 ± 0,07  | 0,637 | 0,422 | 0,966 | 0,218        | 0,847 |
| <i>Roseburia hominis</i>            | 0,27 ± 0,38  | 0,21 ± 0,26  | 0,51 ± 1,62  | 0,45 ± 0,62  | 0,38 ± 1,16  | 0,33 ± 0,48  | 0,944 | 0,756 | 0,867 | 0,144        | 0,141 |
| <i>Trabulsiella odonototermis</i>   | 0,50 ± 1,21  | 0,45 ± 0,63  | 0,60 ± 0,71  | 0,28 ± 0,46  | 0,55 ± 0,99  | 0,36 ± 0,54  | 0,541 | 0,355 | 0,287 | 0,864        | 0,723 |

Resultados expresados como medias ± DE. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negritas,  $p < 0.05$ ; ajustadas por edad, peso al nacer, con/sin dieta): (a) ANCOVA de dos vías, comparaciones entre: <sup>1</sup> peso normal y exceso de peso en el grupo TEA, <sup>2</sup> peso normal y exceso de peso en el grupo DT, <sup>3</sup> peso normal en TEA y DT, <sup>4</sup> exceso de peso en TEA y DT; (b) ANCOVA de una vía, comparación entre <sup>5</sup> peso normal y exceso de peso en todos los participantes. TEA: trastorno del espectro autista; grupo; DT: desarrollo típico; SP: sobrepeso; OB: obesidad.

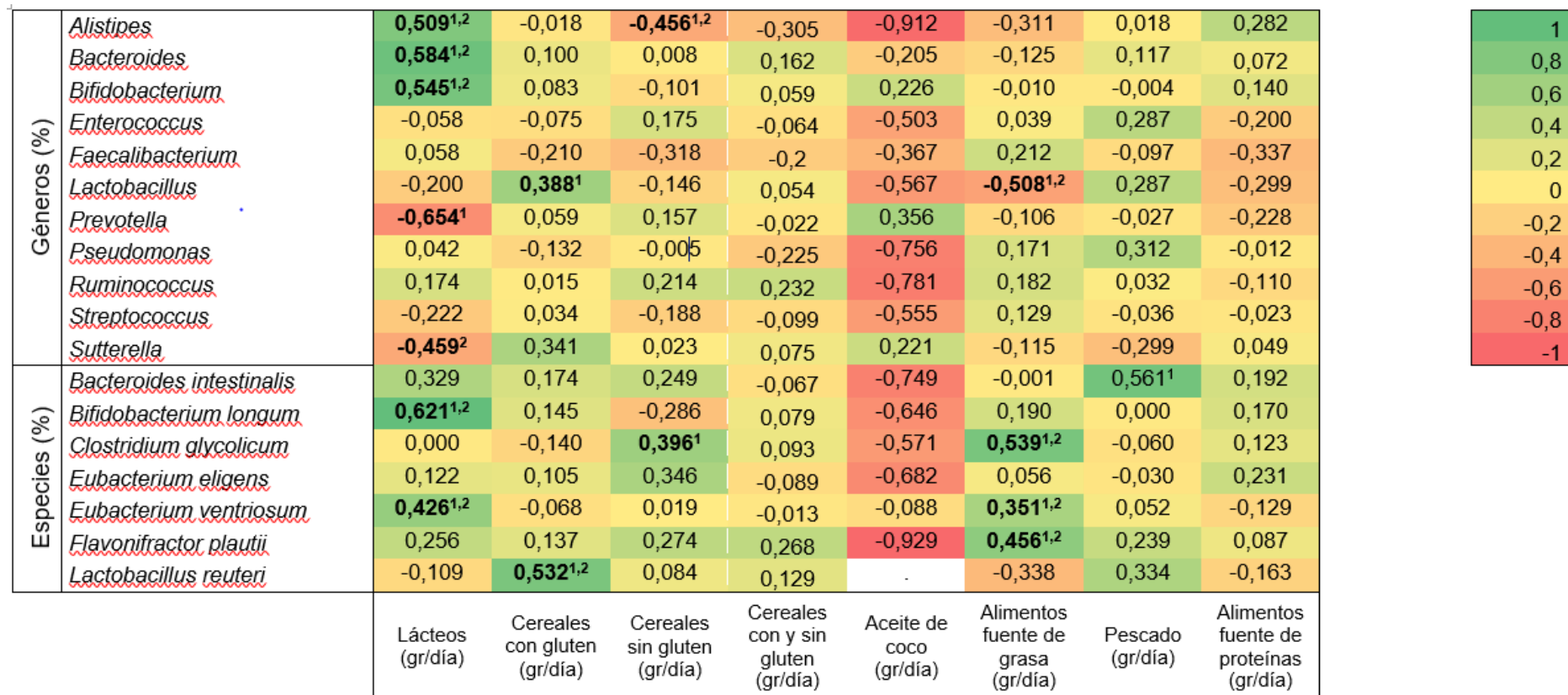
La relación entre las abundancias relativas de géneros y especies bacterianas, y la ingesta dietética de los niños se muestra en la **Figura 8**. Para el análisis aplicamos modelos sin ajustar y ajustados (por edad, DSGC/sin dieta, y TEA/DT). La ingesta de bebidas vegetales presentó asociación con *Enterococcus* (n=10; modelo no ajustado:  $r=0,640$ ,  $p=0,046$ ), *Pseudomona* (n=9; no ajustado:  $r=0,671$ ,  $p=0,048$ ) y *Sutterella* (no ajustado: n=12,  $r=-0,692$ ,  $p=0,013$ ), la cual desapareció luego del ajuste por las covariables; y una relación con *Lactobacillus* independiente de la edad, DSGC/sin dieta, y TEA/DT (n=13; no ajustado:  $r=-0,683$ ,  $p=0,010$ ; ajustado:  $r=-0,906$ ,  $p=0,009$ ). La ingesta de lácteos (n=43) tuvo una asociación con *Bacteroides* (no ajustado:  $r=0,353$ ,  $p=0,020$ ; ajustado:  $r=0,435$ ,  $p=0,048$ ) y *Bifidobacterium longum* (no ajustado:  $r=0,503$ ,  $p=0,001$ ; ajustado:  $r=0,552$ ,  $p=0,009$ ), que permaneció después de aplicar las covariables; y también con *Bifidobacterium* (no ajustado: n=43,  $r=0,320$ ,  $p=0,036$ ) y *Prevotella* (no ajustado: n=43,  $r=-0,380$ ,  $p=0,012$ ), que no se mantuvo tras el ajuste. Los cereales con gluten no mostraron correlación significativa con los géneros o las especies de las bacterias. Sin embargo, los cereales sin gluten (n=58) mostraron relación con *Alistipes* (no ajustado:  $r=-0,336$ ,  $p=0,015$ ; ajustado:  $r=-0,373$ ,  $p=0,024$ ), *Bifidobacterium longum* (no ajustado:  $r=-0,418$ ,  $p=0,003$ ; ajustado:  $r=-0,537$ ,  $p=0,006$ ) y *Clostridium glycolicum* (n=58; no ajustado:  $r=0,364$ ,  $p=0,009$ ; ajustado:  $r=0,374$ ,  $p=0,021$ ), independiente de los factores de confusión. Además, estos presentaron una asociación con *Bifidobacterium* (n=56; no ajustado:  $r=-0,290$ ,  $p=0,041$ ), que desapareció tras el ajuste por las covariables. Por otra parte, la asociación entre la ingesta de cereales con y sin gluten, con *Eubacterium eligens* (n=58; no ajustado:  $r=-0,290$ ,  $p=0,027$ ), y de la ingesta de aceite de coco con *Ruminococcus* (n=58; no ajustado:  $r=-0,532$ ,  $p=0,011$ ) desapareció después del ajuste. La relación entre la ingesta de aceite de coco y *Bacteroides intestinalis* (n=58 no ajustado:  $r=-0,891$ ,  $p=0,001$ ; ajustado:  $r=-0,776$ ,  $p=0,021$ ), y de los alimentos fuente de grasa (n=58) con *Clostridium glycolicum* (no ajustado:  $r=0,442$ ,  $p=0,001$ ; ajustado:  $r=-0,430$ ,  $p=0,001$ ), *Eubacterium ventriosum* (no ajustado:  $r=0,356$ ,  $p=0,008$ ; ajustado:  $r=0,518$ ,  $p=0,004$ ) y *Flavonifactor plautii* (no ajustado:  $r=0,325$ ,  $p=0,026$ ; ajustado:  $r=0,337$ ,  $p=0,026$ ) fue independiente de los factores de confusión. La ingesta de pescado se asoció

con *Bacteroides intestinalis* (n=28; no ajustado:  $r=0,582$ ,  $p=0,023$ ) únicamente en el modelo sin ajustar. Los alimentos fuente de proteína presentaron una relación con *Faecalibacterium* (n=58; no ajustado:  $r=-0,358$ ,  $p=0,006$ ; ajustado:  $r=-0,349$ ,  $p=0,007$ ), *Lactobacillus* (n=49; no ajustado:  $r=-0,365$ ,  $p=0,010$ ; ajustado:  $r=-0,398$ ,  $p=0,005$ ) y *Lactobacillus reuteri* (n=58; no ajustado:  $r=-0,363$ ,  $p=0,044$ ; ajustado:  $r=-0,413$ ,  $p=0,027$ ), en el modelo ajustado y no ajustado por factores de confusión, pero con *Streptococcus* la asociación desapareció luego de tener en cuenta los posibles confusores (n=56; no ajustado:  $r=-0,287$ ,  $p=0,032$ ).



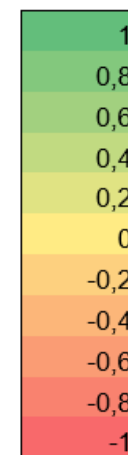
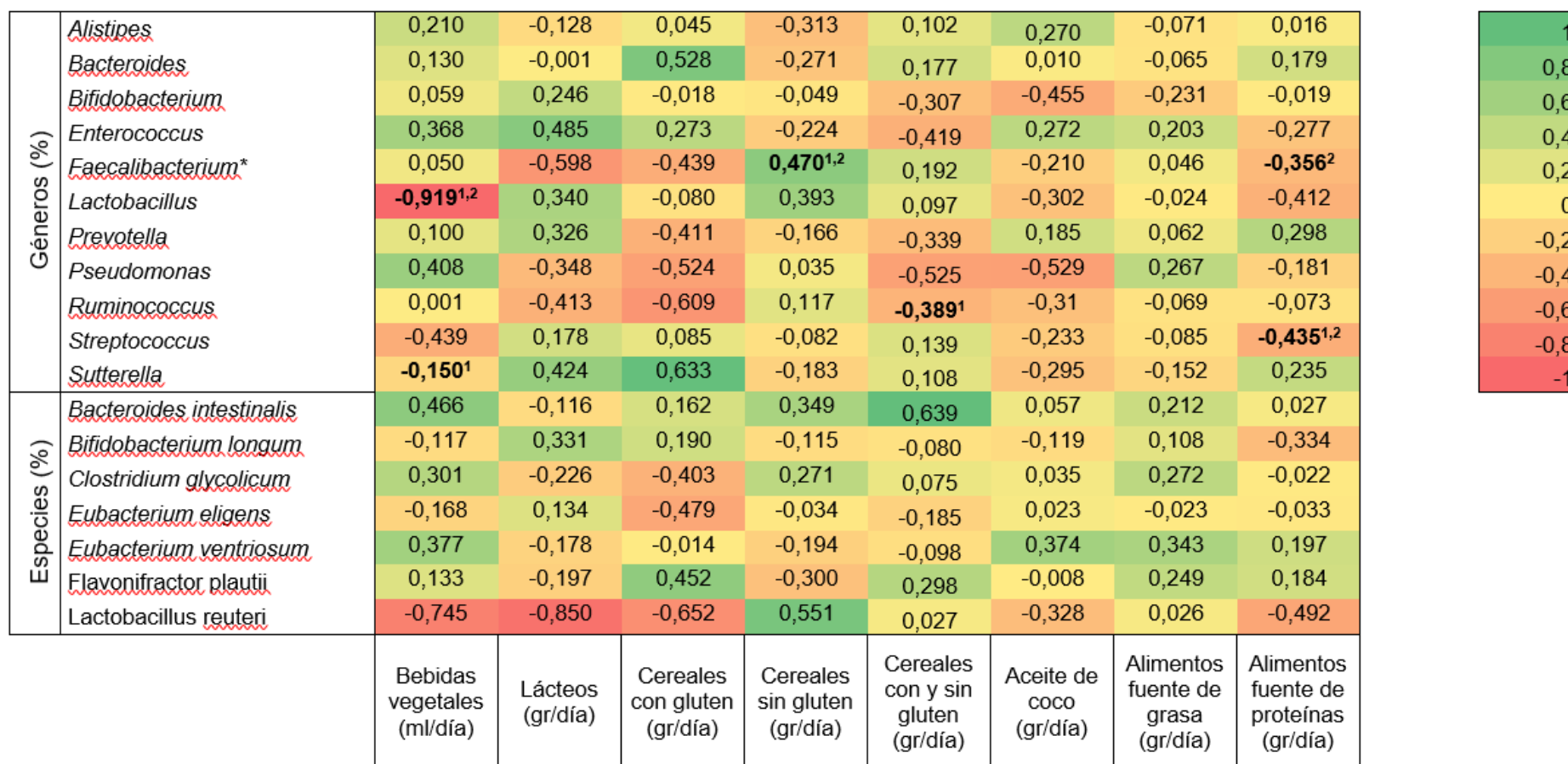
**Figura 8.** Mapa de calor de la asociación entre los géneros y las especies de bacterias y la ingesta dietética en niños con trastorno del espectro autista y neurotípicos. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita,  $p < 0.05$ ; modelo de regresión lineal <sup>1</sup> no ajustado, y <sup>2</sup> ajustado por edad, dieta libre de gluten y caseína/no dieta, TEA/DT. Los valores de R presentados corresponden al modelo ajustado. TEA: trastorno del espectro autista; DT: desarrollo típico.

La asociación entre los géneros y las especies de bacterias, y la ingesta dietética de los niños con desarrollo típico se muestra en la **Figura 9**, donde fueron utilizados el modelo ajustado por la edad y el no ajustado. La ingesta de lácteos (n=43) tuvo una asociación con *Alistipes*, (no ajustado:  $r=0,427$ ,  $p=0,026$ ; ajustado:  $r=0,509$ ,  $p=0,022$ ), *Bacteroides* (no ajustado:  $r=0,498$ ,  $p=0,008$ ; ajustado:  $r=0,584$ ,  $p=0,007$ ), *Bifidobacterium ventriosum* (no ajustado:  $r=0,388$ ,  $p=0,046$ ; ajustado:  $r=0,545$ ,  $p=0,013$ ), *Bifidobacterium longum* (no ajustado:  $r=0,544$ ,  $p=0,004$ ; ajustado:  $r=0,621$ ,  $p=0,007$ ) y *Eubacterium ventriosum* (no ajustado:  $r=0,541$ ,  $p=0,004$ ; ajustado:  $r=0,426$ ,  $p=0,021$ ), independiente de la edad; pero la asociación con *Prevotella* (no ajustado:  $r=-0,547$ ,  $p=0,003$ ) desapareció tras el ajuste, y la relación con *Sutterella* (ajustado:  $r=-0,459$ ,  $p=0,045$ ) sólo apareció cuando se consideró la covariable. Los cereales con gluten mostraron una relación con *Lactobacillus* (no ajustado: n=49,  $r=0,525$ ,  $p=0,007$ ) que desapareció tras el ajuste, y con *Lactobacillus reuteri* permaneció independiente (no ajustado: n=58,  $r=0,579$ ,  $p=0,015$ , y ajustado:  $r=0,532$ ,  $p=0,047$ ). La ingesta de cereales sin gluten tuvo una asociación con *Alistipes*, independiente de la edad (no ajustado: n=58,  $r=-0,439$ ,  $p=0,028$ ; ajustado:  $r=-0,456$ ,  $p=0,028$ ); pero la asociación con *Clostridium glycolicum* desapareció cuando se consideró el factor confusor (no ajustado: n=58,  $r=0,402$ ,  $p=0,047$ ). Los alimentos fuente de grasa presentaron una asociación con *Lactobacillus* (n=49, no ajustado:  $r=-0,563$ ,  $p=0,003$ ; ajustado:  $r=-0,508$ ,  $p=0,004$ ), *Clostridium glycolicum* (n=58; no ajustado:  $r=0,546$ ,  $p=0,003$ ; ajustado:  $r=0,539$ ,  $p=0,004$ ), *Eubacterium ventriosum* (n=58; no ajustado:  $r=0,407$ ,  $p=0,035$ ; ajustado:  $r=0,351$ ,  $p=0,050$ ), *Flavonifactor plautii* (n=58; no ajustado:  $r=0,487$ ,  $p=0,016$ ; ajustado:  $r=0,456$ ,  $p=0,021$ ) que se mantuvo tras el ajuste. El pescado mostró una asociación con *Bacteroides intestinalis* (no ajustado: n=58,  $r=0,555$ ,  $p=0,039$ ) pero desapareció después de considerar la edad. No se encontraron asociaciones significativas entre los géneros o las especies de bacterias y los cereales con y sin gluten, el aceite de coco y los alimentos fuente de proteínas.



**Figura 9.** Mapa de calor de la asociación entre los géneros y las especies de bacterias y la ingesta dietética en niños con desarrollo típico. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita,  $p < 0.05$ ; modelo de regresión lineal <sup>1</sup> no ajustado, y <sup>2</sup> ajustado por edad. Los valores R presentados corresponden al modelo ajustado.

La asociación entre la ingesta dietética y la abundancia relativa de géneros y especies de bacterias en los niños con TEA se muestra en la **Figura 10**. El análisis se realizó con el modelo ajustado por la edad y DLGC/ sin dieta, y sin ajustar. Las bebidas vegetales se asociaron con *Lactobacillus* en ambos modelos (n=49, no ajustado:  $r=-0,620$ ,  $p=0,042$ ; ajustado:  $r=-0,919$ ,  $p=0,034$ ), pero se vio relación con *Sutterella* solo cuando no se consideraron los factores confusores (n=49; no ajustado:  $r=-0,645$ ,  $p=0,032$ ). La ingesta de lácteos, cereales con gluten, aceite de coco y alimentos fuente de grasa no mostró una correlación significativa con las bacterias intestinales. Los cereales sin gluten presentaron una correlación con *Faecalibacterium* que se mantuvo luego de realizar el ajuste (n=58; no ajustado:  $r=0,482$ ,  $p=0,011$ ; ajustado:  $r=0,470$ ,  $p=0,040$ ). Los cereales con y sin gluten se asociaron con *Ruminococcus* (n=58; no ajustado:  $r=-0,388$ ,  $p=0,034$ ) pero esta relación desapareció cuando se consideraron los potenciales factores de confusión. La asociación entre los alimentos fuente de proteínas y *Faecalibacterium* se observó sólo cuando se consideraron las covariables (n=58; ajustado:  $r=-0,356$ ,  $p=0,049$ ); con *Streptococcus* se encontró relación en el modelo ajustado y sin ajustar (n=58; no ajustado:  $r=-0,437$ ,  $p=0,020$ ; ajustado:  $r=-0,435$ ,  $p=0,023$ ).



**Figura 10.** Mapa de calor de la asociación entre los géneros y las especies de bacterias y la ingesta dietética en el grupo con trastorno del espectro autista. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita,  $p < 0.05$ ; modelo de regresión lineal 1 no ajustado, y 2 ajustado por edad, dieta libre de gluten y caseína/no dieta. Los valores R presentados corresponden al modelo ajustado.

La **Tabla 7** muestra la comparación de los géneros y las especies de bacterias intestinales entre los grupos de ingesta dietética, categorizados según el percentil 50, en niños con DT y TEA sin DSGC, por medio de ANOVA de dos vías. Los niños con TEA-no dieta y una ingesta de lácteos >334,3 gr/día tuvieron una mayor abundancia relativa de *Lactobacillus* ( $p=0,025$ ) y *Streptococcus* ( $p=0,003$ ) que aquellos con una ingesta de  $\leq 334,3$  gr/día. En el grupo DT con una ingesta de lácteos >334,3 gr/día, se halló una cantidad mayor de *Alistipes* ( $p=0,013$ ) y *Eubacterium ventriosum* ( $p=0,024$ ) en comparación con los niños con una menor ingesta. Cuando se compararon las bacterias intestinales entre los niños con DT y TEA-no dieta con una ingesta de lácteos >334,3 gr/día, observamos una abundancia relativa más baja de *Faecalibacterium* ( $p=0,005$ ) y una más alta de *Lactobacillus* ( $p=0,012$ ) y *Streptococcus* ( $p=0,009$ ) en los niños TEA-no dieta. Con respecto a los cereales con gluten, *Faecalibacterium* mostró mayor abundancia ( $p=0,042$ ) en los niños con TEA-no dieta con una ingesta >198,35 gr/día que en los DT con la misma ingesta. Los niños con TEA-no dieta con una ingesta de cereales sin gluten  $\leq 7,12$  gr/día tenían más *Flavonifactor plautii* ( $p=0,013$ ) que aquellos con una ingesta >7,12 gr/día. Además, en el grupo con ingesta de cereales sin gluten >7,12 gr/día, *Flavonifactor plautii* ( $p=0,014$ ) y *Eubacterium ventriosum* ( $p=0,017$ ) estaban en mayor cantidad en los niños con DT que en aquellos con TEA-no dieta. En cuanto a los alimentos fuente de grasa, cuando la ingesta era >25 gr/día, había mayor abundancia de *Faecalibacterium* en los niños con DT que en aquellos con TEA-no dieta ( $p=0,031$ ).

**Tabla 7.** Comparación de los géneros y las especies de bacterias intestinales entre los grupos de ingesta dietética (categorizados según el percentil 50) en niños con desarrollo típico y con trastorno del espectro autista sin dieta por medio de ANCOVA de dos vías.

|                                   | Grupo TEA-no<br>dieta              |                                       | Grupo DT                           |                                         | Grupo TEA-no<br>dieta        |                                    | Grupo DT         |                                     | Grupo TEA-no<br>dieta        |                 | Grupo DT        |                 | Grupo TEA-no<br>dieta              |                                     | Grupo DT            |                                     |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Bacterias<br>intestinales         | Lácteos (gr/día)                   |                                       |                                    |                                         | Cereales con gluten (gr/día) |                                    |                  |                                     | Cereales sin gluten (gr/día) |                 |                 |                 | Alimentos fuente de grasa (gr/día) |                                     |                     |                                     |
| Géneros                           | ≤334,<br>3<br>(n=11)               | >334,3<br>(n=3)                       | ≤334,3<br>(n=10)                   | >334,3<br>(n=18)                        | ≤198,3<br>(n=9)              | >198,3<br>(n=5)                    | ≤198,3<br>(n=13) | >198,3<br>(n=15)                    | ≤7,1<br>(n=8)                | >7,1<br>(n=6)   | ≤7,1<br>(n=13)  | >7,1<br>(n=15)  | ≤25,0<br>(n=7)                     | >25,0<br>(n=7)                      | ≤25,0<br>(n=14)     | >25,0<br>(n=14)                     |
| Alistipes                         | 4,07 ±<br>2,81                     | 5,67 ±<br>6,52                        | <b>2,70 ±<br/>1,87<sup>2</sup></b> | <b>5,19 ±<br/>3,05<sup>2</sup></b>      | 4,19 ±<br>3,00               | 4,81 ±<br>4,91                     | 4,63 ±<br>2,50   | 4,01 ±<br>3,30                      | 4,28 ±<br>4,00               | 4,65 ±<br>3,22  | 5,06 ±<br>3,13  | 2,93 ±<br>1,96  | 4,98 ±<br>4,11                     | 3,85 ±<br>3,26                      | 4,85 ±<br>3,00      | 3,75 ±<br>2,84                      |
| Bacteroides                       | 21,57<br>± 8,88                    | 20,56 ±<br>1,23                       | 22,24<br>±<br>11,41                | 25,68<br>± 9,48                         | 20,74<br>± 7,52              | 22,45<br>± 9,12                    | 22,97<br>± 6,37  | 25,74 ±<br>12,64                    | 3,91 ±<br>3,40               | 4,79 ±<br>3,95  | 5,06 ±<br>3,07  | 3,64 ±<br>2,71  | 21,34<br>± 6,80                    | 21,36 ±<br>9,28                     | 26,76<br>±<br>11,47 | 22,14<br>± 8,40                     |
| Bifidobacterium                   | 4,58 ±<br>3,99                     | 2,87 ±<br>1,48                        | 2,26 ±<br>1,59                     | 4,24 ±<br>2,44                          | 5,34 ±<br>4,04               | 2,19 ±<br>1,46                     | 4,06 ±<br>2,15   | 3,08 ±<br>2,49                      | 3,82 ±<br>3,60               | 4,74 ±<br>3,92  | 4,16 ±<br>2,57  | 2,99 ±<br>2,08  | 3,66 ±<br>3,21                     | 4,77 ±<br>4,18                      | 3,36 ±<br>2,16      | 3,71 ±<br>2,59                      |
| Faecalibacterium                  | 13,12<br>± 4,04                    | <b>6,55 ±<br/>2,55<sup>4</sup></b>    | 14,14<br>± 5,02                    | <b>15,68<br/>±<br/>5,19<sup>4</sup></b> | 12,88<br>± 4,42              | <b>9,60 ±<br/>4,67<sup>4</sup></b> | 15,58<br>± 4,12  | <b>14,74 ±<br/>5,93<sup>4</sup></b> | 12,27<br>± 4,83              | 10,96<br>± 4,67 | 16,20<br>± 6,15 | 14,20<br>± 3,95 | 12,08<br>± 4,85                    | <b>11,34 ±<br/>4,74<sup>4</sup></b> | 13,97<br>± 5,57     | <b>16,29<br/>± 4,46<sup>4</sup></b> |
| Lactobacillus                     | <b>0,50 ±<br/>0,41<sup>1</sup></b> | <b>2,96 ±<br/>5,10<sup>1,4</sup></b>  | 1,24 ±<br>2,00                     | <b>0,35 ±<br/>0,34<sup>4</sup></b>      | 0,51 ±<br>0,44               | 1,95 ±<br>3,86                     | 0,78 ±<br>1,76   | 0,57 ±<br>0,63                      | 0,40 ±<br>0,41               | 1,86 ±<br>3,45  | 0,94 ±<br>1,74  | 0,43 ±<br>0,61  | 0,44 ±<br>0,43                     | 1,61 ±<br>3,21                      | 0,99 ±<br>1,73      | 0,35 ±<br>0,35                      |
| Streptococcus                     | <b>0,86 ±<br/>0,89<sup>1</sup></b> | <b>7,43 ±<br/>12,22<sup>1,4</sup></b> | 0,78 ±<br>0,53                     | <b>1,95 ±<br/>2,00<sup>4</sup></b>      | 1,02 ±<br>0,92               | 4,53 ±<br>9,51                     | 2,18 ±<br>2,07   | 0,97 ±<br>1,13                      | 4,26 ±<br>8,50               | 0,78 ±<br>0,91  | 1,97 ±<br>2,19  | 1,15 ±<br>1,10  | 0,81 ±<br>0,96                     | 3,73 ±<br>7,88                      | 1,13 ±<br>1,53      | 1,93 ±<br>1,85                      |
| <i>Suterella</i>                  | 2,33 ±<br>2,14                     | 1,38 ±<br>1,29                        | 2,36 ±<br>1,73                     | 1,46 ±<br>1,75                          | 1,73 ±<br>1,72               | 2,85 ±<br>2,43                     | 1,88 ±<br>2,05   | 1,69 ±<br>1,54                      | 1,92 ±<br>2,25               | 2,40 ±<br>1,73  | 1,63 ±<br>1,72  | 1,91 ±<br>1,85  | 1,43 ±<br>1,36                     | 2,82 ±<br>2,36                      | 1,47 ±<br>1,79      | 2,09 ±<br>1,74                      |
| Especies                          |                                    |                                       |                                    |                                         |                              |                                    |                  |                                     |                              |                 |                 |                 |                                    |                                     |                     |                                     |
| <i>Bifidobacterium<br/>longum</i> | 1,29 ±<br>3,01                     | 0,47 ±<br>0,15                        | 0,47 ±<br>0,50                     | 1,62 ±<br>2,12                          | 1,51 ±<br>3,32               | 0,39 ±<br>0,23                     | 1,22 ±<br>1,93   | 1,20 ±<br>1,75                      | 0,34 ±<br>0,26               | 2,14 ±<br>4,02  | 1,37 ±<br>1,81  | 1,07 ±<br>1,84  | 0,45 ±<br>0,25                     | 1,78 ±<br>3,78                      | 0,68 ±<br>0,52      | 1,74 ±<br>2,42                      |
| <i>Clostridium<br/>glycolicum</i> | 0,49 ±<br>0,50                     | 0,78 ±<br>0,45                        | 0,25 ±<br>0,21                     | 0,34 ±<br>0,35                          | 0,63 ±<br>0,56               | 0,41 ±<br>0,31                     | 0,37 ±<br>0,38   | 0,26 ±<br>0,22                      | 0,43 ±<br>0,26               | 0,71 ±<br>0,68  | 0,22 ±<br>0,21  | 0,39<br>± 0,36  | 0,47 ±<br>0,37                     | 0,64 ±<br>0,60                      | 0,23 ±<br>0,22      | 0,39 ±<br>0,36                      |

|                               |             |             |                                |                                 |             |             |              |              |                                |                                |               |                                 |             |             |              |              |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------|---------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>Eubacterium ventriosum</i> | 9,57 ± 8,76 | 5,04 ± 4,80 | <b>5,76 ± 7,79<sup>2</sup></b> | <b>16,36 ± 7,13<sup>2</sup></b> | 9,60 ± 8,82 | 6,82 ± 7,31 | 14,95 ± 8,35 | 10,52 ± 9,10 | 10,76 ± 8,64                   | <b>5,73 ± 7,11<sup>4</sup></b> | 11,50 ± 10,21 | <b>13,51 ± 7,81<sup>4</sup></b> | 8,20 ± 9,63 | 9,01 ± 7,10 | 10,83 ± 9,08 | 14,33 ± 8,66 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>  | 0,22 ± 0,47 | 0,01 ± 0,03 | 0,14 ± 0,33                    | 0,38 ± 0,43                     | 0,25 ± 0,52 | 0,04 ± 0,08 | 0,27 ± 0,32  | 0,32 ± 0,49  | 0,31 ± 0,53                    | 0,00 ± 0,01                    | 0,35 ± 0,50   | 0,25 ± 0,33                     | 0,24 ± 0,57 | 0,12 ± 0,23 | 0,35 ± 0,45  | 0,24 ± 0,38  |
| <i>Flavonifactor Plautii</i>  | 0,73 ± 1,03 | 0,86 ± 1,24 | 0,38 ± 0,49                    | 1,18 ± 0,95                     | 0,67 ± 1,10 | 0,91 ± 0,97 | 1,11 ± 0,91  | 0,70 ± 0,86  | <b>1,27 ± 1,12<sup>1</sup></b> | <b>0,08 ± 0,11<sup>1</sup></b> | 0,71 ± 0,89   | 1,05 ± 0,90                     | 0,68 ± 0,84 | 0,83 ± 1,25 | 0,69 ± 0,56  | 1,10 ± 1,12  |

Resultados expresados como media ± DS. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita, p<0,05). ANOVA de dos vías, comparaciones entre: <sup>1</sup> los grupos de ingesta dietética más baja y más alta en niños con TEA-no dieta; <sup>2</sup> grupos de ingesta dietética más baja y más alta en niños con DT; <sup>3</sup> niños con TEA-no dieta y con DT en el grupo de ingesta dietética más baja; <sup>4</sup> niños con TEA-no dieta y con DT en el grupo de ingesta dietética más alta. TEA-no dieta: niños con trastorno del espectro autista sin dieta restringida; DT: desarrollo típico.

La **Tabla 8** muestra la comparación de los géneros y las especies de bacterias intestinales entre los grupos de ingesta dietética, categorizados según el percentil 50, en niños con TEA y DSGC. Se observó una mayor abundancia de *Alistipes* ( $p=0,002$ ) y menor de *Lactobacillus* ( $p=0,004$ ), en el grupo con una ingesta de bebidas vegetales  $>309,5$  ml/día en comparación con los niños cuya ingesta era  $\leq 309,5$  ml/día. Se encontraron niveles más altos de *Faecalibacterium* ( $p=0,045$ ) en los individuos que consumieron  $>102,46$  gr/día de cereales sin gluten en comparación con aquellos con ingestas más bajas. No se encontró ninguna diferencia significativa cuando se compararon las bacterias intestinales entre las ingestas más altas y más bajas de alimentos fuente de proteínas.

**Tabla 8.** Comparación de los géneros y las especies de bacterias intestinales entre los grupos de ingesta dietética (categorizados según el percentil 50) en niños con trastorno del espectro autista y una dieta libre de gluten y caseína.

| Bacterias intestinales        | Bebidas vegetales (ml/día) |               |                          | Cereales sin gluten (gr/día) |               |                          | Alimentos fuente de proteínas (gr/día) |               |                    |
|-------------------------------|----------------------------|---------------|--------------------------|------------------------------|---------------|--------------------------|----------------------------------------|---------------|--------------------|
| Géneros                       | ≤309,5 (n=8)               | >309,5 (n=8)  | P                        | ≤102,4 (n=8)                 | >102,4 (n=8)  | p                        | ≤183,6 (n=8)                           | >183,6 (n=8)  | p                  |
| <i>Alistipes</i>              | 1,56 ± 1,11                | 5,64 ± 2,51   | <b>0,002<sup>1</sup></b> | 2,69 ± 2,46                  | 4,51 ± 3,01   | 0,327 <sup>1</sup>       | 3,60 ± 3,41                            | 3,60 ± 2,32   | 0,860 <sup>1</sup> |
| <i>Bacteroides</i>            | 22,72 ± 8,34               | 25,24 ± 14,77 | 0,111 <sup>1</sup>       | 24,13 ± 12,24                | 23,82 ± 11,91 | 0,559 <sup>1</sup>       | 22,44 ± 5,66                           | 25,51 ± 15,94 | 0,826 <sup>1</sup> |
| <i>Bifidobacterium</i>        | 2,15 ± 2,28                | 0,73 ± 0,79   | 0,156 <sup>2</sup>       | 2,01 ± 2,35                  | 0,86 ± 0,84   | 0,275 <sup>2</sup>       | 1,36 ± 0,91                            | 1,52 ± 2,48   | 0,936 <sup>2</sup> |
| <i>Faecalibacterium</i>       | 14,90 ± 4,60               | 17,77 ± 10,02 | 0,458 <sup>1</sup>       | 12,59 ± 6,12                 | 20,08 ± 7,54  | <b>0,045<sup>1</sup></b> | 16,72 ± 3,84                           | 15,95 ± 10,55 | 0,862 <sup>2</sup> |
| <i>Lactobacillus</i>          | 1,06 ± 0,67                | 0,22 ± 0,22   | <b>0,004<sup>2</sup></b> | 0,64 ± 0,75                  | 0,64 ± 0,58   | 0,925 <sup>2</sup>       | 0,94 ± 0,56                            | 0,34 ± 0,62   | 0,062 <sup>2</sup> |
| <i>Streptococcus</i>          | 0,60 ± 0,31                | 0,38 ± 0,33   | 0,476 <sup>2</sup>       | 0,47 ± 0,38                  | 0,51 ± 0,30   | 0,476 <sup>2</sup>       | 0,60 ± 0,32                            | 0,38 ± 0,32   | 0,090 <sup>2</sup> |
| <i>Suterella</i>              | 1,12 ± 1,61                | 0,11 ± 0,14   | 0,108 <sup>2</sup>       | 1,11 ± 1,61                  | 0,12 ± 0,15   | 0,124 <sup>2</sup>       | 0,89 ± 1,60                            | 0,34 ± 0,68   | 0,372 <sup>2</sup> |
| Especies                      |                            |               |                          |                              |               |                          |                                        |               |                    |
| <i>Bifidobacterium longum</i> | 0,31 ± 0,67                | 0,15 ± 0,23   | 0,923 <sup>1</sup>       | 0,37 ± 0,68                  | 0,09 ± 0,12   | 0,511 <sup>1</sup>       | 0,16 ± 0,23                            | 0,30 ± 0,68   | 0,772 <sup>1</sup> |
| <i>Clostridium glycolicum</i> | 0,39 ± 0,27                | 0,45 ± 0,30   | 0,937 <sup>2</sup>       | 0,30 ± 0,23                  | 0,54 ± 0,28   | 0,147 <sup>2</sup>       | 0,51 ± 0,29                            | 0,34 ± 0,26   | 0,310 <sup>2</sup> |
| <i>Eubacterium ventriosum</i> | 9,08 ± 8,10                | 12,46 ± 10,46 | 0,330 <sup>2</sup>       | 9,10 ± 7,70                  | 12,44 ± 10,76 | 0,401 <sup>2</sup>       | 10,42 ± 8,91                           | 11,11 ± 10,09 | 0,943 <sup>2</sup> |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>  | 0,45 ± 0,56                | 0,13 ± 0,20   | 0,169 <sup>2</sup>       | 0,21 ± 0,27                  | 0,37 ± 0,57   | 0,430 <sup>2</sup>       | 0,49 ± 0,54                            | 0,09 ± 0,18   | 0,059 <sup>2</sup> |
| <i>Flavonifactor Plautii</i>  | 0,72 ± 0,88                | 1,18 ± 2,78   | 0,311 <sup>2</sup>       | 1,44 ± 2,72                  | 0,46 ± 0,82   | 0,511 <sup>2</sup>       | 1,45 ± 2,78                            | 0,46 ± 0,59   | 0,251 <sup>2</sup> |

Los resultados están expresados como media ± DS. Diferencias estadísticamente significativas (indicadas en negrita): p<0,05 (<sup>1</sup> prueba t, <sup>2</sup> prueba Mann Whitney).

## 7.4. Discusión

En el presente estudio, se observaron diferencias en la composición de las bacterias fecales según el estado nutricional y la ingesta dietética en niños con TEA y DT. Varios estudios han mostrado una composición diferente de las bacterias intestinales en niños con TEA en comparación con aquellos con DT (174). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas a nivel de géneros, pero si en las especies, observamos menor abundancia de *Bifidobacterium longum* y mayor abundancia de *Clostridium glycolicum* en el grupo con TEA comparado con el de DT. Wang et al. (175) observaron menor cantidad de *Bifidobacterium spp.* y *Akkermasia muciniphila* en niños con autismo en comparación con los de DT, pero en nuestro estudio, no se observó una diferencia significativa en la abundancia de esta bacteria mucolítica. Nuestros resultados están en concordancia con estudios anteriores que hallaron *Bifidobacterium spp* reducida y *Clostridium spp* elevada en personas con TEA en comparación con los controles, y sugieren que esta última bacteria es determinante para el riesgo de presentar autismo (34, 165, 176). Investigaciones realizadas en 1998, plantearon la hipótesis de que el TEA podría deberse a un contexto de disbiosis con colonización de *Clostridium tetani* y a sus efectos neurotóxicos en las neuronas que producen ácido gamma-aminobutírico (neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central) (114, 177). Otro estudio muestra una correlación positiva entre el clúster XVIII de *Clostridium* y síntomas gastrointestinales como la constipación en sujetos con autismo y neurotípicos (34, 178).

Es interesante que, en el grupo TEA-dieta, *Bifidobacterium (B.)* estaba significativamente más bajo en comparación con el grupo TEA-no dieta, y la ingesta de lácteos tuvo una asociación positiva con esta bacteria y una asociación negativa con los cereales sin gluten en el grupo Todos (TEA+DT). Se ha descrito que una mayor abundancia de *Bifidobacterium* tiene efectos benéficos en la salud dado que inhibe el crecimiento de patógenos al liberar bacteriocinas (179, 180), y un aumento de *B. longum* puede reducir la depresión en los pacientes con síndrome de intestino irritable por cambios en las áreas cerebrales involucradas en la regulación del estado de ánimo (181).

En concordancia con nuestros resultados, un estudio en adultos muestra una asociación significativa entre la dieta libre de gluten y una reducción en la abundancia relativa de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (L.) (182). Es importante destacar que ambos géneros sintetizan ácidos grasos de cadena corta que interactúan con receptores de la mucosa intestinal y contribuyen al mantenimiento de la mucosa, tienen efecto antimicrobiano para los patógenos y pueden revertir los trastornos del intestino hiperpermeable (183). Por lo tanto, se postula que mayores abundancias de *Lactobacillus* en el intestino se asocian a una ingesta mayor de lácteos (184). En el presente estudio, también observamos que los niños con TEA-no dieta y una ingesta de lácteos >334,3 gr/día tenían una media más alta de *Lactobacillus* que aquellos con una ingesta más baja. Por otro lado, el grupo TEA-dieta con una ingesta de bebidas vegetales >309,5 ml/día tenían una menor abundancia de este género bacteriano, que los niños con una ingesta ≤ 309,5 ml/día. Considerando a todos los participantes, las ingestas de bebidas vegetales y de alimentos fuente de proteínas mostraron una asociación negativa con *Lactobacillus* y *L. reuteri*, respectivamente. De esta última especie bacteriana se encontró que revierte déficits sociales en animales de experimentación con TEA (130).

Aparte de esto, la ingesta de bebidas vegetales en Todos los niños, también presentó una asociación positiva con el microorganismo anaerobio facultativo *Enterococcus*, y una negativa con *Sutterella*, sólo en el modelo sin ajustar. En relación a esto, Mangiola et al. (111) informaron de una asociación positiva entre el género *Sutterella* y el desarrollo de autismo en niños. Sin embargo, se ha detectado un aumento de *Enterococcus* en muestras fecales de pacientes con diarrea (185). Además, una bacteria proinflamatoria llamada *Alistipes* (186) se vio en mayor cantidad en los niños con TEA-dieta con una ingesta de bebidas vegetales >309,5 ml/día que en aquellos con una ingesta más baja, pero también se observó una mayor abundancia en los niños con DT y una ingesta de lácteos >334,3 gr/día que en aquellos con una ingesta ≤334,3 gr/día, y en este grupo se constató una asociación positiva entre *Alistipes* y los lácteos. Por otra parte, en los grupos Todos y DT, esta bacteria se relacionó de manera inversa con los cereales sin gluten. Considerando a Todos y los

niños con DT, otra bacteria con propiedades antiinflamatorias llamada *Prevotella* (187) mostró una asociación negativa (sólo en el modelo sin ajustar) con la ingesta de lácteos.

En relación al estado nutricional, los participantes del grupo Todos con exceso de peso tenían una menor abundancia relativa de una bacteria benéfica productora de butirato llamada *Roseburia* (*R.*) (188) que aquellos con normopeso; y *Roseburia* y *R. hominis* se presentaron en mayor abundancia en el grupo TEA-dieta que en el TEA-no dieta. Adicionalmente, se observó en los niños con exceso de peso del grupo con TEA una menor abundancia relativa de *Roseburia*, *Faecalibacterium prausnitzii*, y una mayor abundancia relativa de *E. ventriosum* y *Flavonifactor plautii* que aquellos del grupo con DT y exceso de peso. Un estudio llevado a cabo en Japón mostró que *E. ventriosum* se asociaba de manera significativa a los sujetos con obesidad (189). Además, se describió una abundancia significativamente reducida de esta especie en personas con cáncer colorrectal y eso podría considerarse un biomarcador de riesgo para esa enfermedad (190). Por otro lado, *Faecalibacterium prausnitzii* es responsable de degradar la mucina, producir butirato y péptidos que inhiben la vía del NF- $\kappa$ B en las células epiteliales del intestino con efecto antiinflamatorio, y se lo ha asociado a una abundancia reducida en la obesidad (191, 192).

Recientemente, se ha reportado que comer pan elaborado con trigo transgénico reducido en gliadinas produce una abundancia significativamente mayor de los géneros *Faecalibacterium* y *Roseburia* con cambios potencialmente benéficos en la composición de la microbiota intestinal, debido al aumento de butirato que mantiene la permeabilidad intestinal (193). En nuestro estudio, al considerar el grupo con TEA, observamos que los cereales sin gluten también se correlacionaron de manera positiva con *Faecalibacterium*. Asimismo, observamos que el grupo TEA-dieta tenía una abundancia significativamente mayor de *Faecalibacterium* en los individuos que consumen >102,46 gr/día de cereales sin gluten en comparación con aquellos con menores ingestas. Es relevante mencionar que Jiang et al. (194) observaron una correlación negativa entre las abundancias de

*Faecalibacterium* y la gravedad de la depresión y una sobreexpresión de *Alistipes* en este trastorno psiquiátrico.

Respecto de la ingesta de cereales, otros estudios han mostrado que una alta ingesta de carbohidratos se asocia a una mayor abundancia de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en las muestras fecales (195). En esta investigación, se vio precisamente en el grupo con DT una relación positiva entre la ingesta de cereales con gluten y las abundancias de *Lactobacillus* y *L. reuteri*. Aparte de eso, en comparación, los niños con DT y una ingesta de cereales sin gluten >7,12 gr/día mostraron mayor abundancia de *Flavonifactor (F.) plautii* que el grupo con TEA-no dieta con la misma ingesta alimentaria y, en este último grupo, aquellos con una ingesta ≤7,12 gr/día presentaron mayor abundancia de *F. plautii* que los niños con una ingesta >7,12 gr/día. Recientemente, Mikami et al. (196) informaron que el aumento de la abundancia de esta bacteria en animales, tiene un efecto beneficioso en la modulación de la inflamación intestinal al mediar la supresión de IL-17.

Un número creciente de estudios indican que una dieta basada en alimentos de origen animal, con alta ingesta de proteínas y grasas, parece aumentar una bacteria tolerante a la bilis llamada *Bacteroides* y podría elevar el riesgo de enfermedad intestinal (168, 197). Congruentemente con esto, el presente análisis mostró que la ingesta de pescado se asoció positivamente con *Bacteroides intestinalis* en los grupos Todos y DT (sin ajustar con potenciales factores de confusión). Sin embargo, una investigación en ratones alimentados durante 11 semanas con aceite de pescado describe que, tras la interacción con la microbiota intestinal, hubo menor inflamación del tejido adiposo blanco y activación del receptor tipo Toll en comparación con los alimentados con grasa de cerdo (198). Mas, otra investigación en seres humanos muestra que el consumo de salmón no tiene ningún efecto en la microbiota intestinal de mujeres embarazadas (199).

En lo que refiere a la ingesta de alimentos fuente de grasa, un estudio comparativo en ratones mostró que con una dieta rica en aceite de coco durante dos semanas tenían menor cantidad de *Ruminococcus flavefaciens* que aquellos que habían sido alimentados con aceite

de soja (200). En esa línea, en el grupo Todos encontramos una asociación negativa entre la ingesta de aceite de coco y *Ruminococcus* (modelo sin ajustar) y *Bacteroides intestinalis*. Además, un metaanálisis refiere once estudios en los cuales se observa mayor abundancia de *Ruminococcus* (que participa en la fermentación de las fibras dietéticas) en los niños con TEA que en los niños con DT (174), pero en este estudio no encontramos una diferencia significativa en estos grupos.

En suma, los avances en el análisis de la microbiota intestinal han permitido generar nuevos estudios, pero estos reflejan resultados dispares debido a la complejidad del tema. Una serie de investigaciones muestran que la microbiota intestinal puede modular la función cerebral a través de vías metabólicas y de señalización que están a cargo de la cognición social y la regulación emocional (201). Nuestros resultados muestran como la composición de la microbiota intestinal está relacionada con la ingesta de alimentos, el estado nutricional y el neurodesarrollo. Basándonos en estos resultados y la posibilidad de futuras investigaciones de intervención que estudien la interacción entre dieta, microbiota intestinal y autismo, sería posible establecer una relación clara entre perfiles de bacterias específicas con la ingesta de alimentos y el neurodesarrollo. Esto podría ayudar a establecer estrategias de prevención y tratamientos para el autismo. Se necesitan más estudios que se centren en el análisis de asociaciones en este tema, en una muestra grande de niños, para mejorar las recomendaciones para esta población.

## Limitaciones del estudio

La limitación de esta investigación se relaciona con el tamaño pequeño de la muestra y con las cantidades de ingesta dietética calculadas por el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos en lugar de ser medido de manera directa. Sin embargo, este tipo de cuestionarios económicos son los más utilizados a nivel mundial, y consideramos que esta investigación es un aporte importante al conocimiento del tema y para otras investigaciones, ya que hay pocos estudios que relacionen la microbiota intestinal con la ingesta dietética y el estado nutricional en niños con TEA.

## 7.5. Conclusiones

En este estudio, observamos las diferencias en la composición de las bacterias intestinales en niños con trastorno del espectro autista y desarrollo típico en sólo dos especies (*Bifidobacterium longum* y *Clostridium glycolicum*), pero, cuando analizamos esas dos poblaciones teniendo en cuenta la ingesta dietética y el estado nutricional, pudimos observar más diferencias. Se hallaron asociaciones positivas y negativas entre la ingesta de lácteos, bebidas vegetales, cereales con y sin gluten, alimentos fuente de proteínas, alimentos fuente de grasa y aceite de coco y la microbiota intestinal, independientemente de las potenciales variables de confusión como la edad, el realizar o no una dieta libre de gluten y caseína, y el neurodesarrollo. Además, analizar y comparar las ingestas más altas y más bajas de estos grupos de alimentos nos permitió observar en profundidad cómo se asocian las cantidades de las ingestas de determinados alimentos con la mayor o menor abundancia de bacterias intestinales. A la espera de nuevos estudios, estos resultados podrían considerarse un punto de partida para el tratamiento nutricional de niños con TEA.

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

La presente investigación explora las complejas relaciones existentes entre la ingesta de alimentos, el estado nutricional, la sensibilidad sensorial y la microbiota intestinal en una muestra de niños y adolescentes con y sin trastorno del espectro autista de Uruguay, evidenciando las interconexiones entre todas las variables.

### 8.1. Caracterización de los participantes según el neurodesarrollo

El exceso de peso en la niñez se ha asociado a la resistencia a la insulina, diabetes mellitus y enfermedad cardíaca (135, 202). Asimismo, muchos estudios han descrito una mayor prevalencia de obesidad en niños con autismo, comparados con los de desarrollo típico (203). Los problemas de sueño, la selectividad alimentaria, menor diversidad microbiana, desbalance hormonal y uso de medicamentos, se han identificado como posibles factores de riesgo para presentar sobrepeso u obesidad en las personas con TEA (202). Sin embargo, y en concordancia con la revisión sistemática realizada por Kittana et al. (204), en la presente tesis no se hallaron diferencias entre niños y adolescentes con TEA y DT en relación al estado nutricional.

Coincidiendo con otros resultados reportados (57), en este estudio encontramos menor consumo de lácteos, cereales y pescado por parte de los participantes con autismo en comparación a los de DT. A su vez, obtuvimos una diferencia en la ingesta de bebidas vegetales, aceite de coco y manteca (al compararlos según el neurodesarrollo), pero no fue posible contrastar estos datos con los de otros autores, ya que no se encontraron investigaciones que analicen dichos alimentos. Dichos resultados eran esperables debido a que, dentro de los niños con TEA, más de la mitad realizaban la dieta libre de gluten y caseína.

Por otro lado, en relación a la sensibilidad sensorial, los niños con TEA obtuvieron un puntaje total del cuestionario de perfil sensorial que indica una mayor sensibilidad que los niños sin TEA. Específicamente, encontramos mayor “sensibilidad gustativa/olfativa”,

“sensibilidad táctil”, “baja respuesta sensorial/búsqueda de sensaciones”, y “filtro auditivo”. Del mismo modo, Malhi et al. (205) utilizando el mismo instrumento, observaron una mayor sensibilidad sensorial en 50 niños con TEA comparados con 28 controles, mostrando diferencias significativas en todas las subescalas del cuestionario.

Además de las diferencias a nivel sensorial, se ha reportado una taxonomía microbiana distinta entre los niños con y sin autismo (206). La caracterización de perfiles microbianos no solo permite la identificación de los microbios que pueden estar alterados en el autismo, sino que también puede ayudar a comprender la influencia del microbioma en el TEA (207). Hasta el momento, no está del todo claro cómo puede contribuir al desarrollo de la sintomatología, pero se han trasplantado microbiotas de donantes con TEA a ratones estériles y los mismos mostraron un comportamiento autista (208). Sharon et al. (208) proponen que la microbiota intestinal regula los comportamientos en los ratones mediante la producción de metabolitos neuroactivos, que influyen en esta fisiopatología. Justamente, la investigación de Dan Zhou et al. (209), indica que las diferencias en la presencia de metabolitos precursores de neurotransmisores como serotonina, dopamina, histidina, y GABA entre niños con TEA y con DT, están asociados a alteraciones de las abundancias bacterianas o a bacterias específicas.

En nuestra investigación, al comparar el grupo TEA con el de DT, observamos menor abundancia de *Bifidobacterium longum* y mayor abundancia de *Clostridium glycolicum* en los niños y adolescentes con autismo. Además, dentro del grupo TEA, aquellos que seguían la dieta sin gluten y sin caseína tuvieron menos *Bifidobacterium* (*B.*), *B. adolescentis* y *B. longum* en comparación con los que no realizaban ninguna dieta específica, lo cual podría ser negativo para la salud ya que las bifidobacterias tienen propiedades antiinflamatorias (reducen el nivel de citocinas inflamatorias, como IL-2, interferón- $\gamma$ , IL-4, IL-13 e IL-17A, y aumentan el nivel de la citocina antiinflamatoria IL-10) (210).

## 8.2. Análisis de la ingesta de alimentos: perfil sensorial y microbiota intestinal

### 8.2.1. Cereales

A diferencia de los resultados obtenidos por Plaza-Díaz et al. (145) en 54 preescolares con TEA y 57 con DT de España, donde los que tenían autismo mostraron un mayor consumo de cereales, en el presente estudio constatamos una ingesta mayor en los niños y adolescentes con DT, que en sus pares con TEA. Sin embargo, profundizando en el análisis, observamos que el grupo con autismo, que tenía mayor sensibilidad sensorial, consumía una mayor cantidad de cereales, lo que podría explicarse por su dificultad en incorporar nuevos alimentos (neofobia), la evitación de sabores intensos o comportamientos alimentarios restrictivos descritos en la revisión sistemática de Nimbley et al. (211).

En cuanto a los cereales con gluten, los participantes con autismo mostraron un menor consumo en comparación con los que no tenían este diagnóstico y, por el contrario, se vio una ingesta mayor de los cereales sin gluten. Este resultado, concuerda con el hecho de que algunas personas con autismo adhieren a la dieta sin gluten, ya que consideran la hipótesis del efecto negativo de esta proteína al convertirse en gluteomorfina (frente a una alteración en la digestión y metabolismo de la misma) (60). Además, teniendo en cuenta este resultado, es relevante señalar que existe preocupación por parte de algunos investigadores, respecto al posible aumento de la exposición al arsénico y otros metales pesados que pueden estar contenidos en productos a base de arroz, utilizados en las dietas sin gluten (212).

En relación a la microbiota intestinal, dentro del grupo TEA que no realizaban una dieta restrictiva, los que mostraron una ingesta de cereales sin gluten  $>7,1$  gr/día, tuvieron menor abundancia de *Flavonifactor plautii*, que aquellos con una ingesta  $\leq 7,1$  gr/día. Una menor cantidad de esta bacteria se ha asociado a mayor rigidez arterial y presión arterial siendo aún desconocido su mecanismo de acción (213). El único estudio encontrado que relaciona

la ingesta de alimentos con esta bacteria es el de Amajed et al. (214) en mujeres jóvenes, donde observaron una correlación positiva de este microorganismo con la ingesta de carne roja.

Cabe destacar que, la ingesta de cereales sin gluten se relacionó de manera inversa con *Alistipes* en todos los participantes (sin considerar el neurodesarrollo), y en los niños y adolescentes con DT; y con *Bifidobacterium* y *B. longum* (también en todos), que justamente se caracterizan por ser degradadoras selectivas de los arabinoxilanos presentes en el trigo (215). Estos carbohidratos son prebióticos que llegan intactos al colon porque las enzimas digestivas de los seres humanos no pueden descomponerlos, y las bacterias sacarolíticas los metabolizan, generando así subproductos que sirven de nutrientes para otros géneros bacterianos que producen butirato y propionato. Este proceso es importante para el mantenimiento de la diversidad microbiana en el intestino y se denomina alimentación cruzada (del inglés “*crossfeeding*”).

No obstante, los participantes con TEA que realizaban una dieta sin gluten y caseína, que consumieron una cantidad mayor a 102,4 gr/día de cereales sin gluten, presentaron mayor abundancia de *Faecalibacterium* (comparados con los que tienen menores ingestas en este grupo), bacteria sensible al oxígeno y productora de butirato, que contribuye al mantenimiento de la barrera intestinal y a la modulación del sistema inmune, generando un beneficio para las personas con autismo que presentan alteraciones en estos aspectos (159). También se describió, que los niveles de ácido butírico o triptófano, la integridad de la barrera y la modulación inmunitaria, muestran una posible asociación con la gravedad de los síntomas de la condición autista.

En el grupo con DT, *Lactobacillus* y *L. reuteri* se asociaron positivamente a la ingesta de cereales con gluten, y en esta línea, estudios previos indican que la ingesta de fibras provenientes de cereales (sobre todo integrales) y otros alimentos, promueven el crecimiento de estas bacterias beneficiosas, entre otras (216, 217). En cuanto a los posibles atributos de los *Lactobacillus*, su uso como probiótico con *L. reuteri* (cepa DSM 17938) en

niños con cólicos, se asoció con una disminución significativa en la duración del llanto (218). Otra especie del mismo género, *L. acidophilus*, en un estudio resultó aumentar la concentración y habilidades en algunos niños con TEA luego de ser administrada durante dos meses, mientras que en otro no se vieron resultados positivos en lo que refiere a la actividad mental (219).

### 8.2.2. Lácteos

Los participantes con trastorno del espectro autista con una DSGC, concordantemente, mostraron menor consumo de lácteos que su contraparte sin dieta restrictiva, y al agrupar a todos los niños y adolescentes con TEA se mantuvo una menor ingesta en comparación con aquellos con DT. No obstante, la evidencia sobre los beneficios de llevar a cabo dicha dieta, cuando se tiene el diagnóstico de este trastorno, sigue sin ser concluyente (164). Una revisión sistemática y metaanálisis, basada en 8 estudios con 297 participantes, indica que se requiere seguir investigando para evaluar la eficacia de esta dieta, pero que puede reducir los comportamientos estereotipados y mejorar la cognición (147). Sin embargo, en una investigación desarrollada en Valencia (España), estudiaron los riesgos nutricionales al llevar a cabo dicha dieta en esta etapa de crecimiento, y observaron un IMC más bajo, con menor consumo de calcio y energía total en los niños con TEA que seguían la dieta frente a los que no la hacían (154). Además, el consumo de calcio de estos niños con DSGC, no cumplía con las recomendaciones de ingesta para esas edades.

En la misma línea, Sharp et al. (220) encontraron que el 71% de los participantes con autismo (n=70), de entre 2 a 17 años, y específicamente los que mostraban selectividad alimentaria severa, tenían riesgo de presentar una inadecuada ingesta de calcio, debido al menor consumo de lácteos. En nuestra investigación, también observamos que los participantes con TEA con mayor sensibilidad tenían una menor ingesta de lácteos que sus pares con autismo y funcionamiento típico. Asimismo, es importante destacar que cuando consideramos a todos los niños (TEA + DT), aquellos con una sensibilidad superior, presentaron una ingesta de queso menor que el grupo con FT. En relación a este aspecto,

aproximadamente el 70% de las guías alimentarias basadas en alimentos, recomiendan la ingesta diaria de leche, queso o yogur, ya que contienen nutrientes críticos para el crecimiento y desarrollo (calcio, yodo, potasio, zinc, vitamina A, vitamina D y proteínas de alta calidad) (221).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos indica que una ingesta inadecuada de calcio puede contribuir a una masa ósea reducida y al riesgo a desarrollar osteoporosis en la edad adulta o vejez (222). Además, los lácteos aportan otros micronutrientes como magnesio, fósforo, riboflavina, selenio y vitamina B12, que consumidos en cantidades adecuadas contribuyen al desarrollo cerebral y mejor función cognitiva (221). Para los niños pequeños (con capacidad gástrica reducida) puede ser difícil obtener la cantidad y calidad similar de proteínas y micronutrientes a partir de fuentes exclusivamente vegetales.

Por otro lado, investigaciones emergentes, indican que los microbios de los alimentos lácteos fermentados pueden beneficiar la salud ósea, previniendo el desarrollo del intestino hiperpermeable y reduciendo las citocinas osteoclásticas que estimulan la resorción ósea por los osteoclastos (223). En esta investigación, observamos que la ingesta de lácteos se asoció positivamente con *Bifidobacterium* y *B. longum* sin discriminar por el neurodesarrollo (DT + TEA). También se constató mayor abundancia de *Lactobacillus* en los participantes diagnosticados con TEA, sin dieta restrictiva, y que consumían más de 334,3 gr/día de lácteos, en comparación con aquellos con una ingesta menor. En concordancia con estos resultados una revisión sistemática indica que tres estudios han demostrado que la ingesta de leche, yogur y kéfir aumenta la abundancia relativa de estos géneros bacterianos (224). Sumado a ello, se ha reportado que la suplementación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* en forma de probióticos, puede mejorar síntomas gastrointestinales y variables metabólicas como la regulación del anabolismo y catabolismo de 5-hidroxitriptófano, en niños con autismo, pero algunos autores recomiendan su uso solo en aquellos que tengan alteraciones gastrointestinales (219, 225). La mayoría de estos probióticos contienen especies en  $1 \times 10^9$

unidades formadoras de colonia (UFC)/gr, y han mostrado ser seguros (sin presentar efectos secundarios) (226).

No obstante, Fernandez-Raudales et al. (227) describen una disminución del género *Prevotella* en los consumidores de leche bovina, y en nuestros análisis observamos, en todos los niños, independientemente del neurodesarrollo, y en el grupo de DT, una asociación negativa entre este género y la ingesta de lácteos, pero cuando se consideraron los posibles factores confusores como la edad, tipo de dieta o el neurodesarrollo no se mantuvo dicha relación. Por otro lado, también se ha asociado positivamente con la ingesta de alimentos ricos en fibra y con la mejora de la sensibilidad a la insulina, y se ha descrito un mayor índice de masa corporal en personas con mayor abundancia de *Prevotella* pero con baja ingesta de fibras dietéticas (228).

Otro género bacteriano del filo *Bacteroidetes* denominado *Alistipes*, se asoció positivamente con los lácteos en los niños con DT, y los que tuvieron una ingesta >334,3 gr/día tenían mayor abundancia. Estas bacterias constan de 13 especies según los registros taxonómicos y se le han atribuido efectos protectores contra algunas enfermedades (hepáticas, cardiovasculares, colitis, y TEA), pero también se ha asociado a efectos negativos en relación al cáncer de colon, ansiedad, depresión y síndrome de fatiga crónico (186). En cuanto a su asociación con la ingesta de alimentos o bebidas, en la literatura solo se observó una mayor abundancia asociada al consumo de polifenoles de té (229).

### 8.2.3. Bebidas vegetales

Entre los resultados de esta investigación se observó que los niños y adolescentes con TEA, que realizan DSGC, presentan una mayor ingesta de bebidas vegetales en comparación al grupo que no consume dicha dieta. Mas, a pesar del incremento en el consumo y popularidad de las bebidas no lácteas (230), no se ha encontrado otros estudios que describan la ingesta de estas bebidas en personas con y sin TEA o entre los que realizan o no dicha dieta. La comercialización de estas emulsiones extraídas de materias primas vegetales como sustitutos de la leche, no solo se presenta como alternativa a las dietas que

excluyen los lácteos, sino también por el interés en el menor impacto a nivel ambiental (emisiones de gases de efecto invernadero, huella hídrica) o por el bienestar animal que se puede asociar a su consumo (231, 232).

Las bebidas basadas en plantas y fortificadas con calcio han sido incluidas como una alternativa a los productos lácteos en las recomendaciones nutricionales de algunos países (233). Todavía no se ha estudiado en profundidad las consecuencias nutricionales de los cambios recientes en el consumo de lácteos (232). De forma general, las bebidas a base de plantas (almendras, castañas, avena, arroz, y coco, entre otras) aportan menos proteínas, fósforo, colina, cianocobalamina y calcio que la leche, salvo las que están fortificadas. Sin embargo, podría ser positivo para la salud su aporte de antioxidantes, que protegen a las células de los radicales libres, previniendo el desarrollo de enfermedades no transmisibles, pero dependen de los distintos métodos de procesamiento para su producción y almacenamiento, ya que pueden perderse por degradación térmica, oxidación o lixiviación en el agua (231). En suma, se requiere más evidencia científica sobre los posibles beneficios para la salud en humanos.

En este sentido, tampoco se encontró bibliografía sobre la asociación entre la ingesta de estas bebidas y la microbiota intestinal en niños y adolescentes. Nuestros hallazgos muestran una menor abundancia de *Lactobacillus* y mayor de *Alistipes* en el grupo de participantes con TEA que practicaban una dieta libre de gluten y caseína, y presentaban una ingesta de bebidas vegetales mayor a 309,5 ml/día, comparado con aquellos con un consumo menor. Asimismo, teniendo en cuenta a todos los participantes en su conjunto, la ingesta de estas bebidas tuvo una asociación negativa con los géneros *Lactobacillus* (independientemente de la edad, el tipo de dieta y el neurodesarrollo) y *Sutterella* (sólo en el modelo sin ajustar) y positiva con *Enterococcus* (también en el modelo sin ajustar). A diferencia de nuestros resultados, Cakebread et al. (230) encontraron un aumento de la abundancia de *Lactobacillus* en muestras fecales de roedores alimentados con bebida de almendras. Este género se estima que constituye, en los seres humanos sanos, el 6% del

total de las células bacterianas del duodeno y el 0,3% aproximadamente de las del colon (234). Cerca de 50 especies de *Lactobacillus* se han detectado en heces de personas saludables, siendo las más abundantes *L.casei*, *L. delbruckeii*, *L.murinus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. ruminus*, y muchas de ellas se han asociado a un estado de eubiosis intestinal, con efectos benéficos en la modulación del eje intestino cerebro y favoreciendo una mayor función cognitiva.

#### 8.2.4. Alimentos fuente de proteínas

En el estudio realizado por Tomova et al. (184), en 46 niños con TEA y 16 controles, no observaron diferencia significativa en la ingesta de proteínas entre ambos grupos, no obstante, Hyman et al. (235) describieron un menor porcentaje de consumo de proteínas en niños con TEA de 4 a 8 años, con respecto a los neurotípicos. En concordancia con estos resultados, en nuestra investigación los niños con dicha condición mostraron una menor ingesta de pescado que el grupo con DT, pero se vio un mayor consumo de alimentos fuente de proteínas en el grupo TEA con mayor sensibilidad sensorial, que en los niños con autismo y funcionamiento típico. Esto refleja la importancia de considerar también al procesamiento sensorial a la hora de realizar el abordaje nutricional. Por otro lado, un estudio reciente que se llevó a cabo en Australia con 154 niños con TEA y 213 neurotípicos, mostró que los que presentaban autismo y tenían mayor sensibilidad sensorial se vincularon a ingestas dietéticas más saludables (236).

Asimismo, de acuerdo a la literatura, las diferentes fuentes de proteínas de origen animal y vegetal se han asociado con cambios específicos en la microbiota intestinal (104). El consumo excesivo de proteínas de origen animal puede favorecer la producción de metabolitos por parte de las bacterias colónicas, como ácidos grasos de cadena ramificada, ácido fenilacético y compuestos nitrosos, debido al aumento de la fermentación proteica, los cuales se han asociado a efectos adversos para la salud, como el cáncer de colon (237). Esencialmente, una dieta hiperproteica puede estar ligada a una baja ingesta de carbohidratos, que conlleva una menor secreción de ácido butírico, debido a la reducción de

*Roseburia* y *Eubacterium rectale*, así como menor aporte de fibras dietéticas. Por otro lado, las dietas ricas en proteínas de origen animal se han asociado al enterotipo *Bacteroides* con una reducción de las bacterias sacarolíticas (106). Sumado a ello, entre los resultados obtenidos en esta investigación, observamos una asociación negativa entre la ingesta de alimentos fuente de proteínas y *L. reuteri* cuando no se tiene en cuenta el neurodesarrollo, pero el consumo de pescado en todos los participantes (TEA + DT) y el grupo de DT se asoció positivamente con *Bacteroides intestinalis*, género bacteriano reconocido por mejorar la hiperpermeabilidad intestinal (159).

#### 8.2.5. Alimentos fuente de grasas

Como era de esperar, los niños y adolescentes con autismo que realizaban dieta restrictiva tenían una mayor ingesta de ghee, con respecto a aquellos que no realizaban dieta. La manteca clarificada denominada “ghee” es un alimento fuente de grasas lácteas saturadas (238), que se utiliza en la DSGC como estrategia para reducir los niveles de caseína (239), y su ingesta en la infancia se asocia a niveles más altos de colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LDL), que predicen un aumento del grosor de la arteria carótida siendo un indicador de riesgo de aterosclerosis (240).

En segundo lugar, los participantes con TEA y DSGC consumían más grasas totales que los que no realizaban la dieta. En este estudio no se planteó como objetivo evaluar el cumplimiento o no de las recomendaciones dietéticas para niños y adolescentes, pero cabe mencionar que las guías internacionales brindan información acerca de la cantidad y calidad de grasas que se deberían consumir, sugiriendo un aporte de entre el 25% al 35% del total de las calorías a partir de la ingesta de lípidos, principalmente para reducir el riesgo de obesidad (241, 242). Además, el consumo excesivo de alimentos con alta densidad energética puede afectar los sistemas de recompensa mediados por neurotransmisores como la dopamina y ácido gamma-aminobutírico y generar desequilibrios en la alimentación, favoreciendo comportamientos impulsivos (53). Adicionalmente a los efectos metabólicos asociados a un patrón de alimentación con alto consumo de grasas (dislipemia, resistencia a

la insulina, e hiperinsulinismo), se ha descrito que puede ocasionar disbiosis, disfunción de la barrera intestinal y filtración de metabolitos bacterianos tóxicos hacia la circulación, contribuyendo a la inflamación sistémica de bajo grado (243).

A pesar de que los ácidos grasos se absorben mayoritariamente en el intestino delgado, su ingesta también impacta en la microbiota intestinal (104); por ejemplo, los ácidos grasos de cadena media, presentes en el aceite de coco virgen, pueden aumentar la abundancia de *Bacteroides* (104, 244). Sin embargo, en nuestro análisis encontramos una asociación negativa entre la ingesta de aceite de coco y los niveles de *Bacteroides intestinalis* y *Ruminococcus*, independientemente del neurodesarrollo. Ambas bacterias son anaerobias estrictas y se encuentran en menor proporción que las anaerobias facultativas como *Lactobacillus* (243). *B. intestinalis* tiene la capacidad de fermentar fibras dietéticas y producir ácidos grasos de cadena corta, que sirven de nutrientes para las células epiteliales del colon, además produce aminos como espermidina y putrescina que colaboran en mantener la homeostasis de la mucosa intestinal, por lo cual se le atribuyeron propiedades antiinflamatorias (245). *Ruminococcus* se ha asociado positivamente a la ingesta de fibra dietética, ya que también produce ácidos grasos de cadena corta al fermentar los carbohidratos no digeribles como almidón resistente y celulosa, generando el ácido butírico, que presenta efecto inmunomodulador (246). Bamberger et al. (247) observaron, en personas adultas sanas, un incremento en la abundancia de este género bacteriano tras la ingesta de 43 gr al día de nueces, por ocho semanas.

### 8.3. Estado nutricional: ingesta dietética y microbiota intestinal

Si bien existen evidencias que plantean que una mayor ingesta de lácteos disminuye el riesgo de desarrollar obesidad, en el presente estudio (248) las diferencias en la ingesta de este grupo de alimentos se dieron en el grupo normopeso. Donde encontramos que los niños y adolescentes con autismo, que tenían un estado nutricional normal, consumían una menor cantidad de lácteos, que sus pares con DT. Asimismo, en el metaanálisis llevado a cabo por Esteban-Figuerola et al. (57) se describe que los niños con TEA no cumplen con la

recomendación de ingesta de lácteos para su edad. Allí incluyeron 16 estudios sobre la ingesta de calcio, y concluyen que hay un menor consumo de este mineral por parte de los niños con autismo en comparación a los controles (57). Cabe destacar que, en un estudio realizado en niños y adolescentes de China, se observó que el consumo de lácteos estaba inversamente relacionado con el retraso del crecimiento y la obesidad (249).

En relación con el consumo de cereales y alimentos fuente de proteínas, cuando se diferenció a la población de estudio según el estado nutricional, no se observaron diferencias entre los grupos. Cabe destacar que no ha sido posible contrastar estos resultados con literatura científica, ya que no se encontraron artículos que describan el consumo de alimentos según el estado nutricional que presentan niños y adolescentes con y sin autismo.

En el presente estudio, en los participantes con TEA y normopeso, en comparación con los de DT y el mismo estado nutricional, observamos un mayor consumo de aceite de coco, que al igual que la manteca y el ghee, aporta grasas saturadas, con un perfil de ácidos grasos de 82% saturados, aproximadamente la mitad ácido láurico y el resto mirístico, palmítico, esteárico y ácidos grasos de cadena corta (238). Cox et al. (250) realizaron un estudio en individuos con hipercolesterolemia moderada y observaron valores más altos de colesterol total y de las LDL en individuos que realizaban ingesta rica en manteca o en aceite de coco, en comparación con el grupo que consumió aceite de cártamo rico en grasas poliinsaturadas. Asimismo, en una revisión sistemática más reciente, se identificó (en seis ensayos controlados) un aumento del colesterol LDL en suero de forma significativa, tras el consumo del aceite de coco, lo cual puede considerarse como un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (251). Esto es relevante ya que las mismas son reportadas como la principal causa de muerte a nivel mundial, siendo la aterosclerosis la principal (252). Además, existe evidencia científica que muestra asociación entre la ingesta de ácidos grasos saturados y el aumento de la adiposidad corporal (253).

En cuanto a la microbiota intestinal, al evaluar a los niños y adolescentes sin considerar su neurodesarrollo, aquellos con exceso de peso tuvieron menor abundancia de *Roseburia* que los que tenían normopeso. Sin embargo, Mondot et al. (254) observaron menor abundancia del género *Roseburia* en pacientes con anorexia nerviosa en comparación a los controles e indicaron que niveles bajos de esta bacteria se han asociado con otras patologías como Diabetes Mellitus tipo II (255). En adición, considerando al grupo con TEA, aquellos que no seguían la dieta sin gluten y caseína, presentaron menos *Roseburia* y *R. hominis* que quienes la realizaban. Curiosamente, este género bacteriano se presenta con mayor abundancia en personas que siguen una dieta vegetariana, además se ha observado un aumento de su abundancia relativa tras la ingesta de betaglucanos de la avena, y se ha vinculado a la producción de ácido propiónico (246) y ácido butírico (256). Estos ácidos grasos de cadena corta, activan los receptores acoplados a proteínas G presentes en adipocitos, células inmunes y epiteliales del intestino (257). La activación del receptor GPR41 y GPR43 induce la secreción de péptidos tirosina-tirosina (PYY) que estimula al sistema nervioso central y reduce el apetito de la persona. Asimismo, el acoplamiento de GPR41 favorece la liberación de leptina por los adipocitos, la cual actúa en el hipotálamo inhibiendo al neuropéptido Y, generando la disminución del apetito y el aumento del gasto energético. En suma, los metabolitos producidos por bacterias del intestino, estimulan la oxidación de las grasas, previniendo la obesidad inducida por una alimentación hiperlipídica, mejoran los perfiles lipídicos sanguíneos, la homeostasis de la glucosa y favorecen la reducción del peso corporal (187).

Por otra parte, teniendo en cuenta a los niños con TEA con exceso de peso, se constató una menor abundancia de *Roseburia* y *Faecalibacterium prausnitzii*, y mayor de *Eubacterium ventriosum* y *Flavonifactor plautii* que aquellos con DT y exceso de peso. Esta última bacteria, que se caracteriza por degradar flavonoides, se ha visto en mayor abundancia en personas con cáncer de colon, en la India. Al estar en exceso podría reducir la biodisponibilidad de estos polifenoles, disminuyendo el efecto protector frente a esta patología (258). No obstante, en otro estudio se asoció a *E. ventriosum* (bacteria productora

de butirato) como factor de prevención contra el cáncer de colon, ya que al verse disminuida su abundancia relativa (por consumo de alcohol) aumentó el riesgo de presentar esta enfermedad (259). Cabe destacar, que *Faecalibacterium prausnitzii* es de las especies que más produce ácido butírico y se ha descrito que promueve el gasto energético, aumentando la actividad mitocondrial mediante la activación de la proteína quinasa que incrementa el consumo de adenosin trifosfato (ATP) y favorece la reducción de peso (257). Es así, que en un estudio con animales de experimentación, al aumentar la abundancia de *F. prausnitzii* se mitigó la ganancia de peso tras una dieta rica en grasas y la inflamación a nivel hepático e intestinal (260, 261). Por otro lado, *Roseburia* es un género bacteriano antiinflamatorio que se ha visto aumentado en niños con autismo en comparación a controles sanos, pero no hay datos que muestren su comparación teniendo en cuenta el estado nutricional, tal como realizamos en esta investigación. Por último, las bacterias del género *Prevotella*, del filo Bacteroidetes, se han visto en mayor abundancia en personas con obesidad en comparación con los normopeso (248), contrariamente a lo que observamos en este estudio donde no hubo diferencias significativas al respecto.

Dado que en Latinoamérica las familias manifiestan preocupación e inseguridad en los cuidados de salud brindados a personas con TEA (25), considero de suma importancia los hallazgos obtenidos en el marco de mis estudios de doctorado, pudiendo ser utilizados como insumo para otras investigaciones, con un tamaño muestral más amplio, y estudios longitudinales que permitan adquirir un mayor conocimiento científico en esta temática para un abordaje nutricional basado en evidencia actualizada.

## 9. REFERENCIAS

1. Ronan V, Yeasin R, Claud EC. Childhood Development and the Microbiome-The Intestinal Microbiota in Maintenance of Health and Development of Disease During Childhood Development. *Gastroenterology*. 2021;160(2):495-506.
2. Norero VC. [Brain development in childhood. Acquisition and evolution of children's understanding of death]. *Rev Chil Pediatr*. 2018;89(1):137-42.
3. Patton GC, Sawyer SM, Santelli JS, Ross DA, Afifi R, Allen NB, et al. Our future: a Lancet commission on adolescent health and wellbeing. *Lancet*. 2016;387(10036):2423-78.
4. Arain M, Haque M, Johal L, Mathur P, Nel W, Rais A, et al. Maturation of the adolescent brain. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:449-61.
5. Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, et al. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci*. 1999;2(10):861-3.
6. Wu XY, Zhuang LH, Li W, Guo HW, Zhang JH, Zhao YK, et al. The influence of diet quality and dietary behavior on health-related quality of life in the general population of children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Qual Life Res*. 2019;28(8):1989-2015.
7. Bryant-Waugh R. Feeding and Eating Disorders in Children. *Psychiatr Clin North Am*. 2019;42(1):157-67.
8. Prado EL, Dewey KG. Nutrition and brain development in early life. *Nutr Rev*. 2014;72(4):267-84.
9. Ogata BN, Hayes D. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: nutrition guidance for healthy children ages 2 to 11 years. *J Acad Nutr Diet*. 2014;114(8):1257-76.
10. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2019;393(10184):1958-72.
11. Perler BK, Friedman ES, Wu GD. The Role of the Gut Microbiota in the Relationship Between Diet and Human Health. *Annu Rev Physiol*. 2023;85:449-68.

12. Wang W, Yan Y, Yu F, Zhang W, Su S. Role of oral and gut microbiota in childhood obesity. *Folia Microbiol (Praha)*. 2023;68(2):197-206.
13. Orbe-Orihuela YC, Godoy-Lozano EE, Lagunas-Martínez A, Castañeda-Márquez AC, Murga-Garrido S, Díaz-Benítez CE, et al. Association of Gut Microbiota with Dietary-dependent Childhood Obesity. *Arch Med Res*. 2022;53(4):407-15.
14. Saeed NK, Al-Beltagi M, Bediwy AS, El-Sawaf Y, Toema O. Gut microbiota in various childhood disorders: Implication and indications. *World J Gastroenterol*. 2022;28(18):1875-901.
15. Hyman SL, Levy SE, Myers SM. Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics*. 2020;145(1).
16. Frances AJ, Widiger T. Psychiatric diagnosis: lessons from the DSM-IV past and cautions for the DSM-5 future. *Annu Rev Clin Psychol*. 2012;8:109-30.
17. Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet*. 2018;392(10146):508-20.
18. Robins DL, Fein D, Barton ML, Green JA. The Modified Checklist for Autism in Toddlers: an initial study investigating the early detection of autism and pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*. 2001;31(2):131-44.
19. Eadie PA, Ukoumunne O, Skeat J, Prior MR, Bavin E, Bretherton L, et al. Assessing early communication behaviours: structure and validity of the Communication and Symbolic Behaviour Scales-Developmental Profile (CSBS-DP) in 12-month-old infants. *Int J Lang Commun Disord*. 2010;45(5):572-85.
20. Lebersfeld JB, Swanson M, Clesi CD, O'Kelley SE. Systematic Review and Meta-Analysis of the Clinical Utility of the ADOS-2 and the ADI-R in Diagnosing Autism Spectrum Disorders in Children. *J Autism Dev Disord*. 2021;51(11):4101-14.
21. Zeidan J, Fombonne E, Scora J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, et al. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res*. 2022;15(5):778-90.

22. Sivamaruthi BS, Suganthi N, Kesika P, Chaiyasut C. The Role of Microbiome, Dietary Supplements, and Probiotics in Autism Spectrum Disorder. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(8).
23. Doherty M, Haydon C, Davidson IA. Recognising autism in healthcare. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2021;82(12):1-7.
24. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*. 2018;67(6):1-23.
25. Paula CS, Cukier S, Cunha GR, Irrarázaval M, Montiel-Nava C, Garcia R, et al. Challenges, priorities, barriers to care, and stigma in families of people with autism: Similarities and differences among six Latin American countries. *Autism*. 2020;24(8):2228-42.
26. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(11):1095-102.
27. Modabbernia A, Velthorst E, Reichenberg A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism*. 2017;8:13.
28. Amadi CN, Orish CN, Frazzoli C, Orisakwe OE. Dietary interventions for autism spectrum disorder: An updated systematic review of human studies. *Psychiatriki*. 2022;33(3):228-42.
29. Nadeem MS, Al-Abbasi FA, Kazmi I, Murtaza BN, Zamzami MA, Kamal MA, et al. Multiple Risk Factors: A Challenge in the Management of Autism. *Curr Pharm Des*. 2020;26(7):743-54.
30. Genovese A, Butler MG. The Autism Spectrum: Behavioral, Psychiatric and Genetic Associations. *Genes (Basel)*. 2023;14(3).

31. Hughes HK, Moreno RJ, Ashwood P. Innate immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder (ASD). *Brain Behav Immun*. 2023;108:245-54.
32. Szachta P, Skonieczna-Żydecka K, Adler G, Karakua-Juchnowicz H, Madlani H, Ignyś I. Immune related factors in pathogenesis of autism spectrum disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(14):3060-72.
33. Mukherjee SB. Autism Spectrum Disorders - Diagnosis and Management. *Indian J Pediatr*. 2017;84(4):307-14.
34. Srikantha P, Mohajeri MH. The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9).
35. Hirota T, King BH. Autism Spectrum Disorder: A Review. *Jama*. 2023;329(2):157-68.
36. Shimabukuro TT, Grosse SD, Rice C. Medical expenditures for children with an autism spectrum disorder in a privately insured population. *J Autism Dev Disord*. 2008;38(3):546-52.
37. Leader G, Abberton C, Cunningham S, Gilmartin K, Grudzien M, Higgins E, et al. Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Nutrients*. 2022;14(7):1471.
38. Molloy CA, Manning-Courtney P. Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and autistic spectrum disorders. *Autism*. 2003;7(2):165-71.
39. Nikolov RN, Bearss KE, Lettinga J, Erickson C, Rodowski M, Aman MG, et al. Gastrointestinal symptoms in a sample of children with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*. 2009;39(3):405-13.
40. Xue M, Brimacombe M, Chaaban J, Zimmerman-Bier B, Wagner GC. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J Child Neurol*. 2008;23(1):6-13.
41. Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol*. 2011;11:22.

42. Mahapatra S, Vyshedsky D, Martinez S, Kannel B, Braverman J, Edelson SM, et al. Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) Norms: A "Growth Chart" for ATEC Score Changes as a Function of Age. *Children (Basel)*. 2018;5(2).
43. Schneider CK, Melmed RD, Barstow LE, Enriquez FJ, Ranger-Moore J, Ostrem JA. Oral human immunoglobulin for children with autism and gastrointestinal dysfunction: a prospective, open-label study. *J Autism Dev Disord*. 2006;36(8):1053-64.
44. Ristori MV, Quagliariello A, Reddel S, Ianiro G, Vicari S, Gasbarrini A, et al. Autism, Gastrointestinal Symptoms and Modulation of Gut Microbiota by Nutritional Interventions. *Nutrients*. 2019;11(11).
45. Moreno-Aznar LA, Vidal Carou MDC, López Sobaler AM, Varela-Moreiras G, Moreno Villares JM. [Role of breakfast and its quality in the health of children and adolescents in Spain]. *Nutr Hosp*. 2021;38(2):396-409.
46. Cohen JFW, Hecht AA, McLoughlin GM, Turner L, Schwartz MB. Universal School Meals and Associations with Student Participation, Attendance, Academic Performance, Diet Quality, Food Security, and Body Mass Index: A Systematic Review. *Nutrients*. 2021;13(3).
47. Sawyer SM, Azzopardi PS, Wickremarathne D, Patton GC. The age of adolescence. *Lancet Child Adolesc Health*. 2018;2(3):223-8.
48. Louzada M, Costa CDS, Souza TN, Cruz GLD, Levy RB, Monteiro CA. Impact of the consumption of ultra-processed foods on children, adolescents and adults' health: scope review. *Cad Saude Publica*. 2022;37(suppl 1):e00323020.
49. Lane MM, Gamage E, Travica N, Dissanayaka T, Ashtree DN, Gauci S, et al. Ultra-Processed Food Consumption and Mental Health: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Nutrients*. 2022;14(13).
50. Fardet A, Rock E. Toward a new philosophy of preventive nutrition: from a reductionist to a holistic paradigm to improve nutritional recommendations. *Adv Nutr*. 2014;5(4):430-46.
51. Scaglioni S, De Cosmi V, Ciappolino V, Parazzini F, Brambilla P, Agostoni C. Factors Influencing Children's Eating Behaviours. *Nutrients*. 2018;10(6).

52. Olivo G, Gaudio S, Schiöth HB. Brain and Cognitive Development in Adolescents with Anorexia Nervosa: A Systematic Review of fMRI Studies. *Nutrients*. 2019;11(8).
53. Norris SA, Frongillo EA, Black MM, Dong Y, Fall C, Lampl M, et al. Nutrition in adolescent growth and development. *Lancet*. 2022;399(10320):172-84.
54. Marshall TA, Curtis AM, Cavanaugh JE, Warren JJ, Levy SM. Higher Longitudinal Milk Intakes Are Associated with Increased Height in a Birth Cohort Followed for 17 Years. *J Nutr*. 2018;148(7):1144-9.
55. Dawson G, Rogers S, Munson J, Smith M, Winter J, Greenson J, et al. Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: the Early Start Denver Model. *Pediatrics*. 2010;125(1):e17-23.
56. Hill AP, Zuckerman KE, Fombonne E. Obesity and Autism. *Pediatrics*. 2015;136(6):1051-61.
57. Esteban-Figuerola P, Canals J, Fernández-Cao JC, Arija Val V. Differences in food consumption and nutritional intake between children with autism spectrum disorders and typically developing children: A meta-analysis. *Autism*. 2019;23(5):1079-95.
58. Cekici H, Sanlier N. Current nutritional approaches in managing autism spectrum disorder: A review. *Nutr Neurosci*. 2019;22(3):145-55.
59. Fiorentino M, Sapone A, Senger S, Camhi SS, Kadzielski SM, Buie TM, et al. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Mol Autism*. 2016;7:49.
60. Baspinar B, Yardimci H. Gluten-Free Casein-Free Diet for Autism Spectrum Disorders: Can It Be Effective in Solving Behavioural and Gastrointestinal Problems? *Eurasian J Med*. 2020;52(3):292-7.
61. Herrera Mejía J, Ramos-Jiménez A, Jiménez Vega F, Campos Vega R, González Córdova AF, Wall-Medrano A. [Functional feeding to alleviate gastrointestinal disorders associated with autism spectrum disorders: A systematic review]. *Nutr Hosp*. 2022;39(3):663-77.

62. Yu Y, Huang J, Chen X, Fu J, Wang X, Pu L, et al. Efficacy and Safety of Diet Therapies in Children With Autism Spectrum Disorder: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Front Neurol.* 2022;13:844117.
63. Silva SV, Malcata FX. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal.* 2005;15(1):1-15.
64. Reichelt KL, Tveiten D, Knivsberg AM, Brønstad G. Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. *Microb Ecol Health Dis.* 2012;23.
65. Cieślińska A, Sienkiewicz-Szłapka E, Wasilewska J, Fiedorowicz E, Chwała B, Moszyńska-Dumara M, et al. Influence of candidate polymorphisms on the dipeptidyl peptidase IV and  $\mu$ -opioid receptor genes expression in aspect of the  $\beta$ -casomorphin-7 modulation functions in autism. *Peptides.* 2015;65:6-11.
66. Fukudome S, Jinsmaa Y, Matsukawa T, Sasaki R, Yoshikawa M. Release of opioid peptides, gluten exorphins by the action of pancreatic elastase. *FEBS Lett.* 1997;412(3):475-9.
67. Sampson HA, Anderson JA. Summary and recommendations: Classification of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30 Suppl:S87-94.
68. Esparham AE, Smith T, Belmont JM, Haden M, Wagner LE, Evans RG, et al. Nutritional and Metabolic Biomarkers in Autism Spectrum Disorders: An Exploratory Study. *Integr Med (Encinitas).* 2015;14(2):40-53.
69. Barcia G, Posar A, Santucci M, Parmeggiani A. Autism and coeliac disease. *J Autism Dev Disord.* 2008;38(2):407-8.
70. Vojdani A, Pangborn JB, Vojdani E, Cooper EL. Infections, toxic chemicals and dietary peptides binding to lymphocyte receptors and tissue enzymes are major instigators of autoimmunity in autism. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003;16(3):189-99.
71. Jyonouchi H, Geng L, Ruby A, Reddy C, Zimmerman-Bier B. Evaluation of an association between gastrointestinal symptoms and cytokine production against common dietary proteins in children with autism spectrum disorders. *J Pediatr.* 2005;146(5):605-10.

72. Salomone E, Charman T, McConachie H, Warreyn P. Prevalence and correlates of use of complementary and alternative medicine in children with autism spectrum disorder in Europe. *Eur J Pediatr*. 2015;174(10):1277-85.
73. Winburn E, Charlton J, McConachie H, McColl E, Parr J, O'Hare A, et al. Parents' and child health professionals' attitudes towards dietary interventions for children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2014;44(4):747-57.
74. Knivsberg AM, Reichelt KL, Høien T, Nødland M. A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutr Neurosci*. 2002;5(4):251-61.
75. Whiteley P, Shattock P, Knivsberg AM, Seim A, Reichelt KL, Todd L, et al. Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Front Hum Neurosci*. 2012;6:344.
76. Fraguas D, Díaz-Caneja CM, Pina-Camacho L, Moreno C, Durán-Cutilla M, Ayora M, et al. Dietary Interventions for Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Pediatrics*. 2019;144(5).
77. Sathe N, Andrews JC, McPheeters ML, Warren ZE. Nutritional and Dietary Interventions for Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2017;139(6).
78. Fernández-Lázaro D, Seco-Calvo J. Nutrition, Nutritional Status and Functionality. *Nutrients*. 15. Switzerland2023.
79. Viani K, Trehan A, Manzoli B, Schoeman J. Assessment of nutritional status in children with cancer: A narrative review. *Pediatr Blood Cancer*. 2020;67 Suppl 3:e28211.
80. Pongutta S, Ajetunmobi O, Davey C, Ferguson E, Lin L. Impacts of School Nutrition Interventions on the Nutritional Status of School-Aged Children in Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2022;14(3).
81. Bozic P, Djordjic V, Markovic L, Cvejic D, Trajkovic N, Halasi S, et al. Dietary Patterns and Weight Status of Primary School Children in Serbia. *Front Public Health*. 2021;9:678346.
82. De Amicis R, Mambrini SP, Pellizzari M, Foppiani A, Bertoli S, Battezzati A, et al. Ultra-processed foods and obesity and adiposity parameters among children and adolescents: a systematic review. *Eur J Nutr*. 2022;61(5):2297-311.

83. Hermes FN, Nunes EEM, Melo CM. Sleep, nutritional status and eating behavior in children: a review study. *Rev Paul Pediatr*. 2022;40:e2020479.
84. Berón C KF, Garibotto G, Martínez N, Píriz M, Colombo K, et al. . Encuesta de Nutrición, Desarrollo Infantil y Salud (ENDIS): informe de la Segunda ronda, mayo de 2018. <http://guiaderecursos.mides.gub.uy/innovaportal/file/99392/1/informe-final.pdf>.
85. Daniela Batyi PC, Adriana Capel, et al. Evaluación del Programa de Alimentación Escolar y monitoreo del estado nutricional de los niños de escuelas públicas y privadas en Uruguay. 2019.
86. Spinelli A, Buoncristiano M, Kovacs VA, Yngve A, Spiroski I, Obreja G, et al. Prevalence of Severe Obesity among Primary School Children in 21 European Countries. *Obes Facts*. 2019;12(2):244-58.
87. Moschonis G, Halilagic A, Karaglan E, Mavrogianni C, Mourouti N, Collins CE, et al. Likelihood of obesity in early and late childhood based on growth trajectory during infancy. *Int J Obes (Lond)*. 2023;47(7):651-8.
88. Su T, Gong J, Tang G, Qiu S, Chen P, Chen G, et al. Structural and functional brain alterations in anorexia nervosa:A multimodal meta-analysis of neuroimaging studies. *Hum Brain Mapp*. 2021;42(15):5154-69.
89. Shmaya Y, Eilat-Adar S, Leitner Y, Reif S, Gabis L. Nutritional deficiencies and overweight prevalence among children with autism spectrum disorder. *Res Dev Disabil*. 2015;38:1-6.
90. van den Boogert F, Klein K, Spaan P, Sizoo B, Bouman YHA, Hoogendijk WJG, et al. Sensory processing difficulties in psychiatric disorders: A meta-analysis. *J Psychiatr Res*. 2022;151:173-80.
91. Ayres AJ. The developmente of perceptual-motor abilities: a theoretical basis for treatmente of dysfunction. *Am J Occup Ther*. 1963;17:221-5.
92. Harricharan S, McKinnon MC, Lanius RA. How Processing of Sensory Information From the Internal and External Worlds Shape the Perception and Engagement With the World in the Aftermath of Trauma: Implications for PTSD. *Front Neurosci*. 2021;15:625490.

93. Kilroy E, Aziz-Zadeh L, Cermak S. Ayres Theories of Autism and Sensory Integration Revisited: What Contemporary Neuroscience Has to Say. *Brain Sci.* 2019;9(3).
94. Marco EJ, Hinkley LB, Hill SS, Nagarajan SS. Sensory processing in autism: a review of neurophysiologic findings. *Pediatr Res.* 2011;69(5 Pt 2):48r-54r.
95. Baranek GT, David FJ, Poe MD, Stone WL, Watson LR. Sensory Experiences Questionnaire: discriminating sensory features in young children with autism, developmental delays, and typical development. *J Child Psychol Psychiatry.* 2006;47(6):591-601.
96. Lyons-Warren AM, Wangler MF, Wan YW. Cluster Analysis of Short Sensory Profile Data Reveals Sensory-Based Subgroups in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21).
97. Corbett BA, Schupp CW, Levine S, Mendoza S. Comparing cortisol, stress, and sensory sensitivity in children with autism. *Autism Res.* 2009;2(1):39-49.
98. Williams ZJ, Failla MD, Gotham KO, Woynaroski TG, Cascio C. Psychometric Evaluation of the Short Sensory Profile in Youth with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord.* 2018;48(12):4231-49.
99. Esposito M, Mirizzi P, Fadda R, Pirollo C, Ricciardi O, Mazza M, et al. Food Selectivity in Children with Autism: Guidelines for Assessment and Clinical Interventions. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20(6).
100. Wang GF, Li WL, Han Y, Gao L, Dai W, Su YY, et al. Sensory Processing Problems and Comorbidities in Chinese Preschool Children with Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord.* 2019;49(10):4097-108.
101. Marí-Bauset S, Zazpe I, Mari-Sanchis A, Llopis-González A, Morales-Suárez-Varela M. Food selectivity in autism spectrum disorders: a systematic review. *J Child Neurol.* 2014;29(11):1554-61.
102. Ranjan S, Nasser JA. Nutritional Status of Individuals with Autism Spectrum Disorders: Do We Know Enough? *Advances in Nutrition.* 2015;6(4):397-407.
103. Malhi P, Venkatesh L, Bharti B, Singhi P. Feeding Problems and Nutrient Intake in Children with and without Autism: A Comparative Study. *Indian J Pediatr.* 2017;84(4):283-8.

104. Berding K, Vlckova K, Marx W, Schellekens H, Stanton C, Clarke G, et al. Diet and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Sowing the Seeds of Good Mental Health. *Adv Nutr.* 2021;12(4):1239-85.
105. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(3):473-93.
106. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Elinav E. Diet-microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(12):742-53.
107. Rosés C, Cuevas-Sierra A, Quintana S, Riezu-Boj JI, Martínez JA, Milagro FI, et al. Gut Microbiota Bacterial Species Associated with Mediterranean Diet-Related Food Groups in a Northern Spanish Population. *Nutrients.* 2021;13(2).
108. McDonnell L, Gilkes A, Ashworth M, Rowland V, Harries TH, Armstrong D, et al. Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1-18.
109. Finegold SM, Dowd SE, Gontcharova V, Liu C, Henley KE, Wolcott RD, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe.* 2010;16(4):444-53.
110. Vuong HE, Hsiao EY. Emerging Roles for the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry.* 2017;81(5):411-23.
111. Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, Fagiuoli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol.* 2016;22(1):361-8.
112. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(11):6459-65.
113. Hatheway CL. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):66-98.
114. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2020;113(12):2019-40.
115. Armet AM, Deehan EC, O'Sullivan AF, Mota JF, Field CJ, Prado CM, et al. Rethinking healthy eating in light of the gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2022;30(6):764-85.

116. Di Profio E, Magenes VC, Fiore G, Agostinelli M, La Mendola A, Acunzo M, et al. Special Diets in Infants and Children and Impact on Gut Microbioma. *Nutrients*. 2022;14(15).
117. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2013;368(17):1575-84.
118. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(1):35-56.
119. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*. 2014;6(263):263ra158.
120. Peralta-Marzal LN, Prince N, Bajic D, Roussin L, Naudon L, Rabot S, et al. The Impact of Gut Microbiota-Derived Metabolites in Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18).
121. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 2018;23(6):716-24.
122. Lim CK, Essa MM, de Paula Martins R, Lovejoy DB, Bilgin AA, Waly MI, et al. Altered kynurenine pathway metabolism in autism: Implication for immune-induced glutamatergic activity. *Autism Res*. 2016;9(6):621-31.
123. Bienenstock J, Kunze W, Forsythe P. Microbiota and the gut-brain axis. *Nutr Rev*. 2015;73 Suppl 1:28-31.
124. Heiss CN, Olofsson LE. The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system. *J Neuroendocrinol*. 2019;31(5):e12684.
125. Santocchi E, Guiducci L, Fulceri F, Billeci L, Buzzigoli E, Apicella F, et al. Gut to brain interaction in Autism Spectrum Disorders: a randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. *BMC Psychiatry*. 2016;16:183.

126. Zurita MF, Cárdenas PA, Sandoval ME, Peña MC, Fornasini M, Flores N, et al. Analysis of gut microbiome, nutrition and immune status in autism spectrum disorder: a case-control study in Ecuador. *Gut Microbes*. 2020;11(3):453-64.
127. Doenyas C. Novel Personalized Dietary Treatment for Autism Based on the Gut-Immune-Endocrine-Brain Axis. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10.
128. Sanctuary MR, Kain JN, Chen SY, Kalanetra K, Lemay DG, Rose DR, et al. Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210064.
129. Shaaban SY, El Gendy YG, Mehanna NS, El-Senousy WM, El-Feki HSA, Saad K, et al. The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutr Neurosci*. 2018;21(9):676-81.
130. Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA, et al. Mechanisms Underlying Microbial-Mediated Changes in Social Behavior in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Neuron*. 2019;101(2):246-59.e6.
131. Liu YW, Liu WH, Wu CC, Juan YC, Wu YC, Tsai HP, et al. Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. *Brain Res*. 2016;1631:1-12.
132. Hsieh CY, Osaka T, Moriyama E, Date Y, Kikuchi J, Tsuneda S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol Rep*. 2015;3(3).
133. Rudzki L, Szulc A. "Immune Gate" of Psychopathology-The Role of Gut Derived Immune Activation in Major Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry*. 2018;9:205.
134. Diolordi L, del Balzo V, Bernabei P, Vitiello V, Donini LM. Eating habits and dietary patterns in children with autism. *Eat Weight Disord*. 2014;19(3):295-301.
135. Doreswamy S, Bashir A, Guarecuco JE, Lahori S, Baig A, Narra LR, et al. Effects of Diet, Nutrition, and Exercise in Children With Autism and Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Cureus*. 2020;12(12):e12222.
136. Cermak SA, Curtin C, Bandini LG. Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(2):238-46.

137. Saravia L, González-Zapata LI, Rendo-Urteaga T, Ramos J, Collese TS, Bove I, et al. Development of a Food Frequency Questionnaire for Assessing Dietary Intake in Children and Adolescents in South America. *Obesity (Silver Spring)*. 2018;26 Suppl 1:S31-s40.
138. Ranjan S, Nasser JA. Nutritional status of individuals with autism spectrum disorders: do we know enough? *Adv Nutr*. 2015;6(4):397-407.
139. Peretti S, Mariano M, Mazzocchetti C, Mazza M, Pino MC, Verrotti Di Pianella A, et al. Diet: the keystone of autism spectrum disorder? *Nutr Neurosci*. 2019;22(12):825-39.
140. Wiggins LD, Rice CE, Barger B, Soke GN, Lee L-C, Moody E, et al. DSM-5 criteria for autism spectrum disorder maximizes diagnostic sensitivity and specificity in preschool children. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*. 2019;54(6):693-701.
141. Ulijaszek SJ, Kerr DA. Anthropometric measurement error and the assessment of nutritional status. *Br J Nutr*. 1999;82(3):165-77.
142. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl*. 2006;450:76-85.
143. Rendo-Urteaga T, Saravia L, Sadalla Collese T, Monsalve-Alvarez JM, González-Zapata LI, Tello F, et al. Reliability and validity of an FFQ for South American children and adolescents from the SAYCARE study. *Public Health Nutrition*. 2020;23(1):13-21.
144. de Groot RH, Ouwehand C, Jolles J. Eating the right amount of fish: inverted U-shape association between fish consumption and cognitive performance and academic achievement in Dutch adolescents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2012;86(3):113-7.
145. Plaza-Diaz J, Flores-Rojas K, Torre-Aguilar MJDL, Gomez-Fernández AR, Martín-Borreguero P, Perez-Navero JL, et al. Dietary Patterns, Eating Behavior, and Nutrient Intakes of Spanish Preschool Children with Autism Spectrum Disorders. *Nutrients*. 2021;13(10):3551.
146. Alamri ES. Efficacy of gluten- and casein-free diets on autism spectrum disorders in children. *Saudi Med J*. 2020;41(10):1041-6.

147. Quan L, Xu X, Cui Y, Han H, Hendren RL, Zhao L, et al. A systematic review and meta-analysis of the benefits of a gluten-free diet and/or casein-free diet for children with autism spectrum disorder. *Nutr Rev.* 2022;80(5):1237-46.
148. Verduci E, D'Elia S, Cerrato L, Comberiati P, Calvani M, Palazzo S, et al. Cow's Milk Substitutes for Children: Nutritional Aspects of Milk from Different Mammalian Species, Special Formula and Plant-Based Beverages. *Nutrients.* 2019;11(8).
149. Aparicio Vizuite A, Rodríguez-Rodríguez E, Lorenzo Mora AM, Sánchez-Rodríguez P, Ortega RM, López-Sobaler AM. [Myths and fallacies in relation to the consumption of dairy products]. *Nutr Hosp.* 2019;36(Spec No3):20-4.
150. Sethi S, Tyagi SK, Anurag RK. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology.* 2016;53(9):3408-23.
151. Zimmer MH, Hart LC, Manning-Courtney P, Murray DS, Bing NM, Summer S. Food variety as a predictor of nutritional status among children with autism. *J Autism Dev Disord.* 2012;42(4):549-56.
152. Sharp WG, Berry RC, McCracken C, Nuhu NN, Marvel E, Saulnier CA, et al. Feeding problems and nutrient intake in children with autism spectrum disorders: a meta-analysis and comprehensive review of the literature. *J Autism Dev Disord.* 2013;43(9):2159-73.
153. Zhu J, Guo M, Yang T, Lai X, Tang T, Chen J, et al. Nutritional Status and Symptoms in Preschool Children With Autism Spectrum Disorder: A Two-Center Comparative Study in Chongqing and Hainan Province, China. *Front Pediatr.* 2020;8:469.
154. Marí-Bauset S, Llopis-González A, Zazpe I, Marí-Sanchis A, Suárez-Varela MM. Nutritional Impact of a Gluten-Free Casein-Free Diet in Children with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord.* 2016;46(2):673-84.
155. Zheng Z, Zhang L, Li S, Zhao F, Wang Y, Huang L, et al. Association among obesity, overweight and autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):11697.

156. Tomchek SD, Dunn W. Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. *Am J Occup Ther.* 2007;61(2):190-200.
157. Vartanian C. Overview of Nutritional Therapy for Autism Spectrum Disorder. *Adv Neurobiol.* 2020;24:527-34.
158. Engin A. Fat Cell and Fatty Acid Turnover in Obesity. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:135-60.
159. Ding X, Xu Y, Zhang X, Zhang L, Duan G, Song C, et al. Gut microbiota changes in patients with autism spectrum disorders. *J Psychiatr Res.* 2020;129:149-59.
160. Kong X, Liu J, Cetinbas M, Sadreyev R, Koh M, Huang H, et al. New and Preliminary Evidence on Altered Oral and Gut Microbiota in Individuals with Autism Spectrum Disorder (ASD): Implications for ASD Diagnosis and Subtyping Based on Microbial Biomarkers. *Nutrients.* 2019;11(9).
161. Nogay NH, Nahikian-Nelms M. Can we reduce autism-related gastrointestinal and behavior problems by gut microbiota based dietary modulation? A review. *Nutr Neurosci.* 2021;24(5):327-38.
162. Cryan JF, O'Riordan KJ, Sandhu K, Peterson V, Dinan TG. The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2020;19(2):179-94.
163. Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M. Dietary Intake, Nutritional Status and Sensory Profile in Children with Autism Spectrum Disorder and Typical Development. *Nutrients.* 2022;14(10):2155.
164. Keller A, Rimestad ML, Friis Rohde J, Holm Petersen B, Bruun Korfitsen C, Tarp S, et al. The Effect of a Combined Gluten- and Casein-Free Diet on Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2021;13(2).
165. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiaro GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms.* 2019;7(1).
166. Merra G, Noce A, Marrone G, Cintoni M, Tarsitano MG, Capacci A, et al. Influence of Mediterranean Diet on Human Gut Microbiota. *Nutrients.* 2020;13(1).

167. Horn J, Mayer DE, Chen S, Mayer EA. Role of diet and its effects on the gut microbiome in the pathophysiology of mental disorders. *Transl Psychiatry*. 2022;12(1):164.
168. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14691-6.
169. Rampelli S, Guenther K, Turrioni S, Wolters M, Veidebaum T, Kourides Y, et al. Pre-obese children's dysbiotic gut microbiome and unhealthy diets may predict the development of obesity. *Commun Biol*. 2018;1:222.
170. Yang YJ, Ni YH. Gut microbiota and pediatric obesity/non-alcoholic fatty liver disease. *J Formos Med Assoc*. 2019;118 Suppl 1:S55-s61.
171. Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I, Van Noten C, Hens N, Vael C, et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathog*. 2013;5(1):10.
172. Lenfestey MW, Neu J. Probiotics in Newborns and Children. *Pediatr Clin North Am*. 2017;64(6):1271-89.
173. De Filippo C, Di Paola M, Giani T, Tirelli F, Cimaz R. Gut microbiota in children and altered profiles in juvenile idiopathic arthritis. *J Autoimmun*. 2019;98:1-12.
174. Iglesias-Vázquez L, Van Ginkel Riba G, Arijá V, Canals J. Composition of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2020;12(3).
175. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(18):6718-21.
176. Weston B, Fogal B, Cook D, Dhurjati P. An agent-based modeling framework for evaluating hypotheses on risks for developing autism: effects of the gut microbial environment. *Med Hypotheses*. 2015;84(4):395-401.
177. Bolte ER. Autism and *Clostridium tetani*. *Med Hypotheses*. 1998;51(2):133-44.

178. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. 2017;5(1):24.
179. Ahmed SA, Elhefnawy AM, Azouz HG, Roshdy YS, Ashry MH, Ibrahim AE, et al. Study of the gut Microbiome Profile in Children with Autism Spectrum Disorder: a Single Tertiary Hospital Experience. *J Mol Neurosci*. 2020;70(6):887-96.
180. Rodiño-Janeiro BK, Vicario M, Alonso-Cotner C, Pascua-García R, Santos J. A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Adv Ther*. 2018;35(3):289-310.
181. Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, et al. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2017;153(2):448-59.e8.
182. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr*. 2009;102(8):1154-60.
183. Al-Ayadhi L, Zayed N, Bhat RS, Moubayed NMS, Al-Muammar MN, El-Ansary A. The use of biomarkers associated with leaky gut as a diagnostic tool for early intervention in autism spectrum disorder: a systematic review. *Gut Pathogens*. 2021;13(1).
184. Tomova A, Soltys K, Kemenyova P, Karhanek M, Babinska K. The Influence of Food Intake Specificity in Children with Autism on Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8).
185. Briggs AD, Kehlbacher A, Tiffin R, Garnett T, Rayner M, Scarborough P. Assessing the impact on chronic disease of incorporating the societal cost of greenhouse gases into the price of food: an econometric and comparative risk assessment modelling study. *BMJ Open*. 2013;3(10):e003543.
186. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Front Immunol*. 2020;11:906.

187. Sakkas H, Bozidis P, Touzios C, Kolios D, Athanasiou G, Athanasopoulou E, et al. Nutritional Status and the Influence of the Vegan Diet on the Gut Microbiota and Human Health. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(2).
188. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014;63(8):1275-83.
189. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:100.
190. Mukherjee A, Lordan C, Ross RP, Cotter PD. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1802866.
191. Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett*. 2014;588(22):4223-33.
192. Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*. 2016;65(3):415-25.
193. Haro C, Villatoro M, Vaquero L, Pastor J, Giménez MJ, Ozuna CV, et al. The Dietary Intervention of Transgenic Low-Gliadin Wheat Bread in Patients with Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS) Showed No Differences with Gluten Free Diet (GFD) but Provides Better Gut Microbiota Profile. *Nutrients*. 2018;10(12).
194. Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*. 2015;48:186-94.
195. Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol*. 2018;9:890.

196. Mikami A, Ogita T, Namai F, Shigemori S, Sato T, Shimosato T. Oral Administration of Flavonifractor plautii, a Bacteria Increased With Green Tea Consumption, Promotes Recovery From Acute Colitis in Mice via Suppression of IL-17. *Front Nutr.* 2020;7:610946.
197. Tsafrakidou P, Michaelidou AM, C GB. Fermented Cereal-based Products: Nutritional Aspects, Possible Impact on Gut Microbiota and Health Implications. *Foods.* 2020;9(6).
198. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 2015;22(4):658-68.
199. Urwin HJ, Miles EA, Noakes PS, Kremmyda LS, Vlachava M, Diaper ND, et al. Effect of salmon consumption during pregnancy on maternal and infant faecal microbiota, secretory IgA and calprotectin. *Br J Nutr.* 2014;111(5):773-84.
200. Patrone V, Minuti A, Lizier M, Miragoli F, Lucchini F, Trevisi E, et al. Differential effects of coconut versus soy oil on gut microbiota composition and predicted metabolic function in adult mice. *BMC Genomics.* 2018;19(1):808.
201. Chernikova MA, Flores GD, Kilroy E, Labus JS, Mayer EA, Aziz-Zadeh L. The Brain-Gut-Microbiome System: Pathways and Implications for Autism Spectrum Disorder. *Nutrients.* 2021;13(12).
202. Dhaliwal KK, Orsso CE, Richard C, Haqq AM, Zwaigenbaum L. Risk Factors for Unhealthy Weight Gain and Obesity among Children with Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13).
203. Şengüzel S, Cebeci AN, Ekici B, Gönen İ, Tatlı B. Impact of eating habits and nutritional status on children with autism spectrum disorder. *J Taibah Univ Med Sci.* 2021;16(3):413-21.
204. Kittana M, Ahmadani A, Williams KE, Attlee A. Nutritional Status and Feeding Behavior of Children with Autism Spectrum Disorder in the Middle East and North Africa Region: A Systematic Review. *Nutrients.* 2023;15(3).
205. Malhi P, Saini S, Bharti B, Attri S, Sankhyan N. Sensory Processing Dysfunction and Mealtime Behavior Problems in Children With Autism. *Indian Pediatr.* 2021;58(9):842-5.

206. Lewandowska-Pietruszka Z, Figlerowicz M, Mazur-Melewska K. Microbiota in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(23).
207. Alamoudi MU, Hosie S, Shindler AE, Wood JL, Franks AE, Hill-Yardin EL. Comparing the Gut Microbiome in Autism and Preclinical Models: A Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:905841.
208. Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, et al. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell.* 2019;177(6):1600-18.e17.
209. Dan Z, Mao X, Liu Q, Guo M, Zhuang Y, Liu Z, et al. Altered gut microbial profile is associated with abnormal metabolism activity of Autism Spectrum Disorder. *Gut Microbes.* 2020;11(5):1246-67.
210. Zhang L, Xu Y, Li H, Li B, Duan G, Zhu C. The role of probiotics in children with autism spectrum disorders: A study protocol for a randomised controlled trial. *PLoS One.* 2022;17(2):e0263109.
211. Nimbley E, Golds L, Sharpe H, Gillespie-Smith K, Duffy F. Sensory processing and eating behaviours in autism: A systematic review. *Eur Eat Disord Rev.* 2022;30(5):538-59.
212. Dennis M, Lee AR, McCarthy T. Nutritional Considerations of the Gluten-Free Diet. *Gastroenterol Clin North Am.* 2019;48(1):53-72.
213. Luo S, Zhao Y, Zhu S, Liu L, Cheng K, Ye B, et al. Flavonifractor plautii Protects Against Elevated Arterial Stiffness. *Circ Res.* 2023;132(2):167-81.
214. Almajed J, Al-Musharaf S, Abudawood M, Sabico S, Aljazairy EA, Aljuraiban GS. Red and White Meat Intake in Relation to Gut Flora in Obese and Non-Obese Arab Females. *Foods.* 2023;12(2).
215. Rivière A, Moens F, Selak M, Maes D, Weckx S, De Vuyst L. The ability of bifidobacteria to degrade arabinoxylan oligosaccharide constituents and derived oligosaccharides is strain dependent. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(1):204-17.

216. So D, Whelan K, Rossi M, Morrison M, Holtmann G, Kelly JT, et al. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2018;107(6):965-83.
217. Tangestani H, Emamat H, Ghalandari H, Shab-Bidar S. Whole Grains, Dietary Fibers and the Human Gut Microbiota: A Systematic Review of Existing Literature. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2020;11(3):235-48.
218. Salvatore S, Pensabene L, Borrelli O, Saps M, Thapar N, Concolino D, et al. Mind the gut: probiotics in paediatric neurogastroenterology. *Benef Microbes*. 2018;9(6):883-98.
219. Sanlier N, Kocabas Ş. The effect of probiotic, prebiotic and gut microbiota on ASD: A review and future perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023;63(15):2319-30.
220. Sharp WG, Postorino V, McCracken CE, Berry RC, Criado KK, Burrell TL, et al. Dietary Intake, Nutrient Status, and Growth Parameters in Children with Autism Spectrum Disorder and Severe Food Selectivity: An Electronic Medical Record Review. *J Acad Nutr Diet*. 2018;118(10):1943-50.
221. Miller GD, Kanter M, Rycken L, Comerford KB, Gardner NM, Brown KA. Food Systems Transformation for Child Health and Well-Being: The Essential Role of Dairy. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(19).
222. Plantz MA, Bittar K. Dietary Calcium. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
223. Rizzoli R, Biver E. Are Probiotics the New Calcium and Vitamin D for Bone Health? *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18(3):273-84.
224. Aslam H, Marx W, Rocks T, Loughman A, Chandrasekaran V, Ruusunen A, et al. The effects of dairy and dairy derivatives on the gut microbiota: a systematic literature review. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1799533.
225. Kong Q, Wang B, Tian P, Li X, Zhao J, Zhang H, et al. Daily intake of *Lactobacillus* alleviates autistic-like behaviors by ameliorating the 5-hydroxytryptamine metabolic disorder

in VPA-treated rats during weaning and sexual maturation. *Food Funct.* 2021;12(6):2591-604.

226. Ng QX, Lim YL, Yaow CYL, Ng WK, Thumboo J, Liew TM. Effect of Probiotic Supplementation on Gut Microbiota in Patients with Major Depressive Disorders: A Systematic Review. *Nutrients.* 2023;15(6).

227. Fernandez-Raudales D, Hoeflinger JL, Bringe NA, Cox SB, Dowd SE, Miller MJ, et al. Consumption of different soymilk formulations differentially affects the gut microbiomes of overweight and obese men. *Gut Microbes.* 2012;3(6):490-500.

228. Stanislawski MA, Dabelea D, Lange LA, Wagner BD, Lozupone CA. Gut microbiota phenotypes of obesity. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2019;5(1):18.

229. Moorthy M, Sundralingam U, Palanisamy UD. Polyphenols as Prebiotics in the Management of High-Fat Diet-Induced Obesity: A Systematic Review of Animal Studies. *Foods.* 2021;10(2).

230. Cakebread J, Wallace OAM, Henderson H, Jauregui R, Young W, Hodgkinson A. The impacts of bovine milk, soy beverage, or almond beverage on the growing rat microbiome. *PeerJ.* 2022;10:e13415.

231. Tong SC, Siow LF, Tang TK, Lee YY. Plant-based milk: unravel the changes of the antioxidant index during processing and storage - a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;1-19.

232. Ramsing R, Santo R, Kim BF, Altema-Johnson D, Wooden A, Chang KB, et al. Dairy and Plant-Based Milks: Implications for Nutrition and Planetary Health. *Curr Environ Health Rep.* 2023;10(3):291-302.

233. Thorning TK, Raben A, Tholstrup T, Soedamah-Muthu SS, Givens I, Astrup A. Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. *Food Nutr Res.* 2016;60:32527.

234. Heeney DD, Gareau MG, Marco ML. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr Opin Biotechnol.* 2018;49:140-7.

235. Hyman SL, Stewart PA, Schmidt B, Cain U, Lemcke N, Foley JT, et al. Nutrient intake from food in children with autism. *Pediatrics*. 2012;130 Suppl 2(Suppl 2):S145-53.
236. Mathew NE, Mallitt KA, Masi A, Katz T, Walker AK, Morris MJ, et al. Dietary intake in children on the autism spectrum is altered and linked to differences in autistic traits and sensory processing styles. *Autism Res*. 2022;15(10):1824-39.
237. Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, et al. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(5):1062-72.
238. Sacks FM, Lichtenstein AH, Wu JHY, Appel LJ, Creager MA, Kris-Etherton PM, et al. Dietary Fats and Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;136(3):e1-e23.
239. Kataria D, Singh G. Health benefits of ghee: Review of Ayurveda and modern science perspectives. *J Ayurveda Integr Med*. 2024;15(1):100819.
240. Raitakari OT, Juonala M, Kähönen M, Taittonen L, Laitinen T, Mäki-Torkko N, et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Jama*. 2003;290(17):2277-83.
241. Fritsche KL. The science of fatty acids and inflammation. *Adv Nutr*. 2015;6(3):293s-301s.
242. O'Connor A, Buffini M, Nugent A, Kehoe L, Flynn A, Walton J, et al. Dietary fat intakes in Irish children: changes between 2005 and 2019. *Public Health Nutr*. 2021;24(5):802-12.
243. Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D, Aringazina R, et al. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. *Cells*. 2021;10(11).
244. Machate DJ, Figueiredo PS, Marcelino G, Guimarães RCA, Hiane PA, Bogo D, et al. Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11).

245. Sun Z, Wang Y, Su X, Yang X, Luo Q. Proteomic Characterization of Human Gut Habitual *Bacteroides intestinalis* against Common Intestinal Bile Acid Stress. *Advanced Gut & Microbiome Research*. 2023;2023:8395946.
246. Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, Yonas W, Alwarith J, Barnard ND, et al. The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Front Nutr*. 2019;6:47.
247. Bamberger C, Rossmeier A, Lechner K, Wu L, Waldmann E, Fischer S, et al. A Walnut-Enriched Diet Affects Gut Microbiome in Healthy Caucasian Subjects: A Randomized, Controlled Trial. *Nutrients*. 2018;10(2).
248. Booth AO, Huggins CE, Wattanapenpaiboon N, Nowson CA. Effect of increasing dietary calcium through supplements and dairy food on body weight and body composition: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr*. 2015;114(7):1013-25.
249. Xu PP, Yang TT, Xu J, Li L, Cao W, Gan Q, et al. Dairy Consumption and Associations with Nutritional Status of Chinese Children and Adolescents. *Biomed Environ Sci*. 2019;32(6):393-405.
250. Cox C, Mann J, Sutherland W, Chisholm A, Skeaff M. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipids and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. *J Lipid Res*. 1995;36(8):1787-95.
251. Eyres L, Eyres MF, Chisholm A, Brown RC. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutr Rev*. 2016;74(4):267-80.
252. Goldsborough E, 3rd, Osuji N, Blaha MJ. Assessment of Cardiovascular Disease Risk: A 2022 Update. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2022;51(3):483-509.
253. González-Becerra K, Ramos-Lopez O, Barrón-Cabrera E, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martínez-López E, et al. Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):178.
254. Mondot S, Lachkar L, Doré J, Blottière HM, Hanachi M. Roseburia, a decreased bacterial taxon in the gut microbiota of patients suffering from anorexia nervosa. *Eur J Clin Nutr*. 2022;76(10):1486-9.

255. Almaguad BS, Liu Y, Chen SM, Wang CH, Shao CY, Ren BW, et al. Alterations of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes Individuals and the Confounding Effect of Antidiabetic Agents. *J Diabetes Res.* 2020;2020:7253978.
256. Balasubramaniam C, Mallappa RH, Singh DK, Chaudhary P, Bharti B, Muniyappa SK, et al. Gut bacterial profile in Indian children of varying nutritional status: a comparative pilot study. *Eur J Nutr.* 2021;60(7):3971-85.
257. Cunningham AL, Stephens JW, Harris DA. A review on gut microbiota: a central factor in the pathophysiology of obesity. *Lipids Health Dis.* 2021;20(1):65.
258. Gupta A, Dhakan DB, Maji A, Saxena R, P KV, Mahajan S, et al. Association of *Flavonifractor plautii*, a Flavonoid-Degrading Bacterium, with the Gut Microbiome of Colorectal Cancer Patients in India. *mSystems.* 2019;4(6).
259. Li H, Sheng D, Jin C, Zhao G, Zhang L. Identifying and ranking causal microbial biomarkers for colorectal cancer at different cancer subsites and stages: a Mendelian randomization study. *Front Oncol.* 2023;13:1224705.
260. Bárcena C, Valdés-Mas R, Mayoral P, Garabaya C, Durand S, Rodríguez F, et al. Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice. *Nat Med.* 2019;25(8):1234-42.
261. Gao X, Xie Q, Kong P, Liu L, Sun S, Xiong B, et al. Polyphenol- and Caffeine-Rich Postfermented Pu-erh Tea Improves Diet-Induced Metabolic Syndrome by Remodeling Intestinal Homeostasis in Mice. *Infect Immun.* 2018;86(1).



## 10. ANEXOS

## ANEXO 1



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Tomás Cerdó,  
Maimonides Biomedical Research Institute of  
Cordoba (IMIBIC), Spain

## REVIEWED BY

Ana Nieto-Ruiz,  
University of Granada, Spain  
Kiran Veer Sandhu,  
University College Cork, Ireland

## \*CORRESPONDENCE

Paula Mendive Dubourdieu  
✉ [mpmendive@nutricion.edu.uy](mailto:mpmendive@nutricion.edu.uy)

RECEIVED 09 April 2023

ACCEPTED 28 June 2023

PUBLISHED 20 July 2023

## CITATION

Mendive Dubourdieu P and Guerendiain M  
(2023) Understanding the link between gut  
microbiota, dietary intake, and nutritional status  
in children with autism and typical  
development. *Front. Nutr.* 10:1202948.  
doi: 10.3389/fnut.2023.1202948

## COPYRIGHT

© 2023 Mendive Dubourdieu and Guerendiain.  
This is an open-access article distributed under  
the terms of the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is permitted,  
provided the original author(s) and the  
copyright owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic practice.  
No use, distribution or reproduction is  
permitted which does not comply with these  
terms.

# Understanding the link between gut microbiota, dietary intake, and nutritional status in children with autism and typical development

Paula Mendive Dubourdieu\* and Marcela Guerendiain

Área de Investigación, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

**Background:** Gut microbiota plays a potential role in human health and different disorders such as autism spectrum disorder (ASD). Therefore, we analyzed gut bacteria composition in children with ASD and typical development (TD), and its relationship with nutritional status and dietary intake.

**Methods:** A descriptive cross-sectional study was carried out in 3- to 12-year-old children (ASD = 30, TD = 28). Dietary intake (applying food frequency questionnaires) and body mass index-for-age (expressed in z-score) were determined. Children were divided into normal weight and excess weight (risk of overweight + overweight + obesity), and the ASD group was categorized into gluten- and casein-free diet (ASD-diet) or no diet (ASD-no diet). The relative abundance of gut bacteria was analyzed in fecal samples by 16S rRNA sequencing.

**Results:** Children with excess weight had lower *Roseburia* than normal weight. Fewer *Bifidobacterium longum* and higher *Clostridium glycolicum* were found in the ASD group compared with TD one. Participants with excess weight and ASD had lower *Roseburia* and *Faecalibacterium prausnitzii* and higher *Eubacterium ventriosum* and *Flavonifractor plautii* than the TD group with the same nutritional status. Positive and negative associations were found between the bacteria genus and species, and the intake of dairy, vegetable drinks, cereals with and without gluten, food source of proteins, fish, food source of fat, and coconut oil, in unadjusted models and after adjustment for age, diet/no diet, ASD/TD.

**Conclusion:** Significant differences in microbial community composition were found between children with ASD and TD, considering their nutritional status and dietary intake.

## KEYWORDS

autism spectrum disorder, gut microbiota, nutritional status, gluten- and casein-free diet, dietary intake, children, adolescents

## Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopment condition that has had a rapidly increasing prevalence. However, there is no standard treatment due to its complex etiology, involving genetic and environmental factors (1, 2). In the last few decades, it has been recognized that gut microbiota plays a major role in human health and different disorders such as autism (3). Multiple cohort studies indicate that several inflammation-related disorders and neurodevelopmental diseases have been associated with alterations in the gut ecosystem, a condition known as dysbiosis (4, 5). For example, a greater relative abundance of certain bacteria such as *Clostridium* and *Sutterella* has been observed in

children with ASD as opposed to typical development (TD) ones, but the findings from different investigations are still controversial (6).

Robust literature data show that there is a two-way communication between gut and the brain, in which microbiota, the enteric nervous system, autonomic nervous system, endocrine system, immune system, and central nervous system are involved (4). Bacterial metabolites have been shown to be implicated in the secretion of neurotransmitters that are part of memory, learning, and behavioral processes (7). Diet plays an important role in gut microbiota homeostasis and metabolism, and children with ASD have difficulties in maintaining a balanced diet due to multiple factors such as highly selective food preference and gastrointestinal problems (8). In addition, many families with children with ASD have chosen to follow a gluten- and casein-free diet (GCFD) under the unproven hypothesis that these proteins are metabolized into gliomorphin and casomorphin and that, via a leaky gut, they bind to opiate receptors in the central nervous system causing autism symptoms (9). There is still no consensus on the use and effectiveness of this type of diet for treating autism, and additional studies are needed to describe the effects of the diet on gut microbiota (9–11).

Dietary intake can modulate gut microbiota throughout life, and this action would depend on the type and amount of foods chosen, which can inflect up to 60% of the microbiome composition since it provides countless substrates for microbial metabolism (12, 13). Furthermore, there are bacteria with specific enzymes that convert certain nutrients into different metabolites that influence brain function (14). For example, from the metabolism of tryptophan, it is possible to obtain indole which has a positive effect on mental health, but another metabolite such as indoxyl sulfate has been linked to the development of ASD.

In relation to food intake and its association with bacterial taxonomy, a study of European children (fed with a Western diet rich in animal protein) and African children (fed with local vegetables and whole grains) showed that children in Burkina Faso have higher levels of *Prevotella* and lower levels of *Bacteroides* and *Enterobacteriaceae* than children from Italy (15). This diet and intestinal microbiota in rural African children have been linked to lower inflammatory conditions and infectious colonic diseases (11, 15). On the contrary, it has been shown that diets with a high intake of red meat, refined carbohydrates and fat, and a lower consumption of fish and vegetables could cause dysbiosis (13).

Moreover, scientific evidence has shown that nutritional status is related to gut microbiota (16). There is a lack of consensus as regards a healthy-type taxonomic microbiome composition, but recent studies show that there is a difference in gut bacteria between obese and lean children and adolescents (17). Bervoets et al. (18) observed that children with obesity had a higher level of *Lactobacillus* spp. and a lower level of *Bifidobacterium vulgatus* than the lean ones. A prospective study showed that obesity in children was associated with an increase in *Bacteroidaceae* and a lower relative abundance of *Prevotellaceae* compared with children with normal weight (16). The relation between gut bacteria and weight gain is still unclear (12).

It has been shown that early intervention in children's gut microbiota can help prevent health disorders, but it is necessary to

elucidate the link between diet and intestinal microbe composition to define a strategy to improve their health (19, 20). The symptoms and comorbidities of ASD could be improved with dietary interventions carried out after a deeper understanding of how foods relate to the intestinal microbiota (14). Therefore, the purpose of this study was to analyze gut bacteria composition in children with ASD and TD, and its relationship with nutritional status and dietary intake.

## Materials and methods

### Participants and ethics statement

From February to March 2020, we recruited a total of 65 children and adolescents aged 3 to 12 years at the nutritionist's office in Montevideo, Uruguay, through an open call (8); in this gut microbiota study, 30 with ASD and 28 neurotypicals were included (Figure 1). Diagnoses of ASD by a psychiatrist or a pediatric neurology specialist met the criteria of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V) (21). Participants had not been taking medication, antibiotics, or probiotics for at least 1 month prior to enrollment in the study, and no children in the TD group were on a restricted diet. In addition, those diagnosed with attention deficit and hyperactivity disorder, diabetes mellitus, genetic diseases, inborn errors of metabolism, inflammatory bowel disease, celiac disease, and motor disability were excluded from both groups. This research was performed in accordance with the Helsinki Declaration 2000, approved by the Research Ethics Committee of the School of Nutrition, University of the Republic, and registered with the Ministry of Health of Uruguay (No. 282599). The study was explained to the participants' parents by telephone and discussed personally during their first visit to the research clinic, where informed written consent was obtained from every parent.

### Sample collection, gut microbiota sequencing, and taxonomic classification

Children's parents were given a fecal microbiota kit (tube with transport media and specimen collection swab) and thorough instructions as to how they should collect the stool samples from their children at home. They collected a single fecal sample that was refrigerated until delivery to the clinic within 48 h. Once received, the samples were transferred to the laboratory with a cold pack and stored in an ultra-freezer at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Extraction of bacterial DNA was performed at Enteria SRL laboratory, which followed the protocol recommended by Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research—Catalog No. D6010). The quantity and quality of DNA were assessed by measuring absorbance at 260 and 280 nm using the Tecan Infinite M200 Pro (absorbance range 1.8–2 OD<sub>280/260</sub>). The extracted genomic DNA was sent to Genia laboratory to amplify hypervariable V1–V9 regions of the 16S rDNA gene from bacteria with Ion 16S™ Metagenomics Kit in PCR cycler using the Ion Torrent™ semiconductor sequencing workflow. Amplified

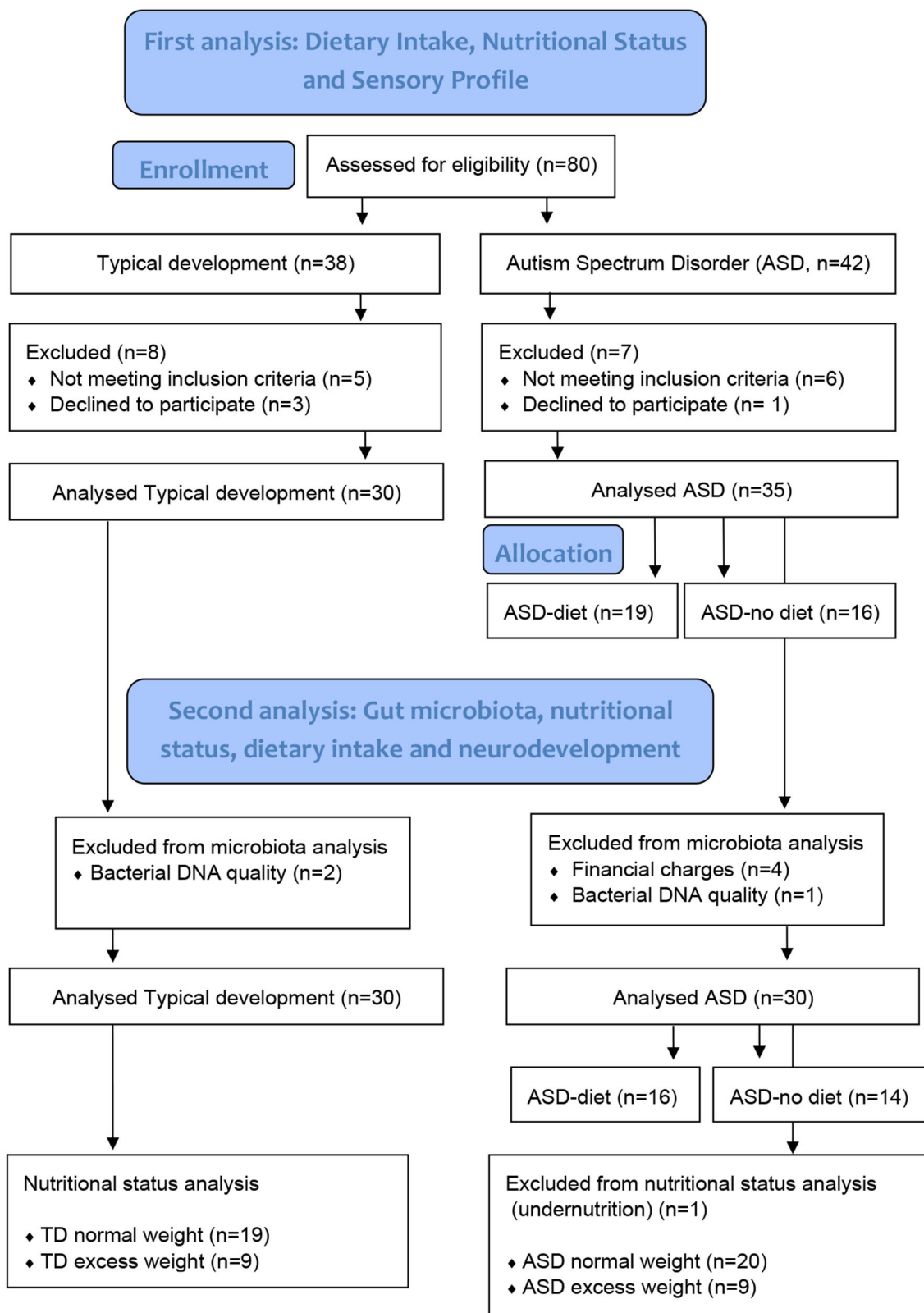


FIGURE 1  
Participants' flow chart.

fragments were sequenced using the Ion PGM™ Sequencing 400 Kit on the Ion PGM™ platform and analyzed using the Ion 16S™ metagenomics analysis module within Ion Reporter™ software.

Stool samples were studied to determine the relative abundance of gut bacteria. Operational taxonomic units (OTUs) were defined at 97% sequence homology, and the abundances of these bacterial genera or species were normalized. Taxonomic classification was performed using the SILVA 128 reference database up to the species level.

## Anthropometric measures and dietary intake

All protocols including anthropometric measures and dietary intake were performed as previously described by Mendive Dubourdieu et al. (8). Participants' height and weight were measured by the same nutritionist researcher. Height was determined by using a portable height rod (208 Seca) with a 810–2,060 mm range and a 1 mm precision, and weight was measured using a portable electronic scale (Seca 813, Hamburg, Germany) with a 100 g accuracy, while subjects were barefoot and wearing light clothing according to techniques standardized by Frisncho (22) and the World Health Organization (WHO) (22, 23). Data were analyzed in Anthro (for children aged 3 to 5 years) and Anthro plus (for children and adolescents aged 5 to 12 years) software (WHO v.1.0.2. 2007), which apply WHO child growth curves (22). Body mass index-for-age (BMI/A), expressed in z-score (z), was the indicator studied to classify children into one of the following categories: normal weight (NW) and excess weight (EW, risk of overweight + overweight + obesity). Cutoff points used for children aged 2–5 years were >3SD, obesity; >2SD, overweight; >1SD, risk of overweight; between <1SD and >-1SD, normal weight; ≤-1SD, risk of wasting; ≤-2SD, emaciation; and ≤-3SD, severe emaciation and in those over 5 years old were ≥2SD, obesity; ≥1SD, overweight; between <1SD and >-2SD, normal weight; ≤-2SD, wasting; and ≤-3SD, severe emaciation. Undernutrition was dismissed because the sample size was small, and therefore, those participants were not considered for anthropometric analysis.

Children with ASD were divided into two groups depending on whether they followed a GCFD (ASD-diet,  $n = 16$ ) or did not have a restricted diet (ASD-no diet,  $n = 14$ ). Food intake over the past 3 months was estimated based on data obtained through the SAYCARE study food frequency questionnaire (FFQ) (24), which was adapted to this study to gather information on the consumption of gluten-free and casein-free foods. Children's parents were asked to indicate the consumption frequency and portion size of each food item according to a food photo booklet as a reference. The average daily consumption of each food (g/day or ml/day) was calculated and organized into different groups as follows: (1) "dairy": milk, yogurt, chocolate milk, dairy desserts, and cheese; (2) "vegetable drinks": birdseed, chestnut, almond, oat, rice, and coconut drinks; (3) "cereals with gluten": pasta, bread, cookies, bakery products, breakfast cereals, pizza, and *empanadas* (dough stuffed with meat, fish, vegetables, etc., baked or fried), "cereals without gluten": the same foods in the previous group without gluten and rice; (4) "food source of proteins": meat, minced

meat, chicken, pork, eggs, fresh and canned fish, and *milanesa* steak with and without gluten (a thin slice of beef dipped in beaten eggs and breaded; the fact that 25% of its weight is due to cereal has been taken into account); (5) "food source of fat": butter, ghee (fat obtained by heating cow milk butter), and oil. Dairy, cereals with gluten, cereals without gluten, food source of fat (for children with typical development and ASD without diet), vegetable drinks, and food source of proteins (for children with ASD and a GCFD) were divided into two subgroups, considering the 50th percentile of the intake (intake ≤ p50 and >p50).

## Statistical analysis

For statistical analyses, IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) was used. We performed the Kolmogorov–Smirnov test to verify variable normal distribution. Data that were not normally distributed were log10 transformed. A  $p$ -value of lower than 0.05 was accepted as significant (two-tailed).

To compare genus and species relative abundance according to neurodevelopment (ASD vs. TD) and between autistic groups (ASD-diet vs. ASD-no diet), independent sample  $t$ -test was assessed. To study bacteria relative abundance according to nutritional status (NW and EW) in ASD and TD children, the two-way ANCOVA was applied (adjusted for age, birth weight, and GCFD/not restricted diet). Pair comparisons between the different groups were adjusted by the Bonferroni *post-hoc* test. Comparison between NW and EW in all children was carried out using one-way ANCOVA and correcting for the same potential confounders.

To evaluate associations between gut microbiota and dietary intake, univariate linear regression was used and adjusted for the following potential confounders: age, GCFD/not restricted diet, and TD/ASD (when all the children were analyzed); age (in the TD group), and age and GCFD/not restricted diet (in the ASD). In children with TD and ASD-no diet, differences in bacterial abundances among food intake p50 groups were examined using two-way ANOVA. Finally, the Student  $t$ -test and Mann–Whitney test were used to determine whether there were differences in gut bacteria relative abundances between those with higher or lower dairy intake in the ASD-diet group.

## Results

Anthropometric characteristics, dietary intake, and age of children with autism spectrum disorder and typical development have been previously published (8). In Table 1, we compared the mean relative abundance of 20 selected genera and 16 species, according to ASD-diet vs. ASD-no diet and ASD vs. TD groups. No significant differences were found in the relative abundances of bacterial genera between neurotypical and ASD children. However, there is a significant difference in the mean relative abundance of *Bifidobacterium* ( $p = 0.008$ ), *Roseburia* ( $p = 0.002$ ), and *Sutterella* ( $p = 0.015$ ) between the ASD-diet and ASD-no diet groups. At the species level, the ASD-diet group showed fewer *Bifidobacterium adolescentis* ( $p = 0.046$ ) and *Bifidobacterium longum* ( $p = 0.002$ ) but higher *Roseburia hominis* ( $p = 0.002$ ) than the ASD-no diet group. Additionally, the ASD group had lower *Bifidobacterium*

TABLE 1 Relative abundance of gut bacteria genus and species in children with autism spectrum disorder and typical development.

| Gut bacteria                        | ASD group            |                         |                          | ASD group<br>(n = 30) | TD group<br>(n = 28) | p**                      |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|
|                                     | ASD-diet<br>(n = 16) | ASD-no diet<br>(n = 14) | p*                       |                       |                      |                          |
| Genus                               |                      |                         |                          |                       |                      |                          |
| <i>Akkermansia</i>                  | 1.39 ± 1.90          | 1.84 ± 2.74             | 0.618 <sup>a</sup>       | 1.60 ± 2.30           | 1.45 ± 2.17          | 0.938 <sup>a</sup>       |
| <i>Alistipes</i>                    | 3.61 ± 2.82          | 4.42 ± 3.61             | 0.494 <sup>b</sup>       | 3.98 ± 3.18           | 4.30 ± 2.92          | 0.565 <sup>b</sup>       |
| <i>Bacteroides</i>                  | 23.98 ± 11.66        | 21.36 ± 7.82            | 0.482 <sup>b</sup>       | 22.75 ± 9.98          | 24.45 ± 10.14        | 0.554 <sup>b</sup>       |
| <i>Bifidobacterium</i>              | 1.44 ± 1.80          | 4.22 ± 3.62             | <b>0.008<sup>a</sup></b> | 2.73 ± 3.09           | 3.53 ± 2.35          | 0.054 <sup>a</sup>       |
| <i>Blautia</i>                      | 2.84 ± 1.11          | 2.34 ± 1.18             | 0.114 <sup>a</sup>       | 2.60 ± 1.15           | 2.65 ± 1.23          | 0.803 <sup>a</sup>       |
| <i>Clostridium</i>                  | 6.47 ± 3.16          | 7.60 ± 3.65             | 0.280 <sup>a</sup>       | 6.99 ± 3.39           | 6.90 ± 3.35          | 0.901 <sup>a</sup>       |
| <i>Coprococcus</i>                  | 0.85 ± 0.84          | 0.63 ± 0.48             | 0.760 <sup>a</sup>       | 0.74 ± 0.63           | 0.77 ± 0.69          | 0.962 <sup>a</sup>       |
| <i>Dialister</i>                    | 0.60 ± 1.10          | 1.36 ± 1.65             | 0.105 <sup>a</sup>       | 0.94 ± 1.40           | 0.67 ± 0.78          | 0.871 <sup>a</sup>       |
| <i>Enterococcus</i>                 | 0.56 ± 2.03          | 0.10 ± 0.10             | 0.427 <sup>a</sup>       | 0.34 ± 1.48           | 0.33 ± 0.83          | 0.122 <sup>a</sup>       |
| <i>Eubacterium</i>                  | 3.66 ± 2.38          | 2.54 ± 1.54             | 0.114 <sup>a</sup>       | 3.13 ± 2.08           | 3.07 ± 2.05          | 0.988 <sup>a</sup>       |
| <i>Faecalibacterium</i>             | 16.34 ± 7.68         | 11.72 ± 4.62            | 0.060 <sup>b</sup>       | 14.18 ± 6.75          | 15.13 ± 5.09         | 0.312 <sup>b</sup>       |
| <i>Lachnoclostridium</i>            | 1.18 ± 0.81          | 0.96 ± 1.09             | 0.561 <sup>a</sup>       | 1.07 ± 0.96           | 0.82 ± 0.71          | 0.586 <sup>a</sup>       |
| <i>Lactobacillus</i>                | 0.64 ± 0.65          | 1.03 ± 2.28             | 0.786 <sup>a</sup>       | 0.82 ± 1.61           | 0.67 ± 1.26          | 0.697 <sup>a</sup>       |
| <i>Prevotella</i>                   | 12.93 ± 12.52        | 10.87 ± 11.72           | 0.739 <sup>a</sup>       | 11.96 ± 11.99         | 6.89 ± 9.16          | 0.093 <sup>a</sup>       |
| <i>Pseudomonas</i>                  | 0.65 ± 2.46          | 0.05 ± 0.05             | 0.683 <sup>a</sup>       | 0.37 ± 1.79           | 0.06 ± 0.06          | 0.534 <sup>a</sup>       |
| <i>Roseburia</i>                    | 3.47 ± 1.98          | 1.32 ± 0.99             | <b>0.002<sup>a</sup></b> | 2.47 ± 1.92           | 2.89 ± 1.92          | 0.304 <sup>a</sup>       |
| <i>Ruminococcus</i>                 | 2.55 ± 1.72          | 2.54 ± 1.23             | 0.618 <sup>a</sup>       | 2.55 ± 1.48           | 2.81 ± 1.34          | 0.350 <sup>a</sup>       |
| <i>Streptococcus</i>                | 0.49 ± 0.33          | 2.27 ± 5.60             | 0.394 <sup>a</sup>       | 1.32 ± 3.86           | 1.53 ± 1.71          | 0.058 <sup>a</sup>       |
| <i>Sutterella</i>                   | 0.62 ± 1.22          | 2.13 ± 1.98             | <b>0.015<sup>a</sup></b> | 1.32 ± 1.77           | 1.78 ± 1.76          | 0.119 <sup>a</sup>       |
| <i>Turicibacter</i>                 | 0.80 ± 1.21          | 0.62 ± 0.65             | 0.868 <sup>a</sup>       | 0.72 ± 0.98           | 0.56 ± 0.60          | 0.749 <sup>a</sup>       |
| Species                             |                      |                         |                          |                       |                      |                          |
| <i>Akkermansia muciniphila</i>      | 1.19 ± 1.40          | 2.27 ± 3.30             | 0.269 <sup>a</sup>       | 1.69 ± 2.49           | 1.75 ± 2.60          | 0.935 <sup>a</sup>       |
| <i>Bacteroides fragilis</i>         | 0.45 ± 0.47          | 1.21 ± 2.85             | 0.301 <sup>a</sup>       | 0.80 ± 1.97           | 1.21 ± 1.32          | 0.075 <sup>a</sup>       |
| <i>Bacteroides intestinalis</i>     | 0.02 ± 0.03          | 0.13 ± 0.33             | 0.944 <sup>a</sup>       | 0.07 ± 0.23           | 0.55 ± 2.43          | 0.453 <sup>a</sup>       |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | 0.30 ± 0.47          | 1.25 ± 2.10             | <b>0.046<sup>a</sup></b> | 0.74 ± 1.52           | 0.65 ± 1.12          | 0.463 <sup>a</sup>       |
| <i>Bifidobacterium longum</i>       | 0.23 ± 0.49          | 1.11 ± 2.67             | <b>0.002<sup>a</sup></b> | 0.64 ± 1.87           | 1.21 ± 1.80          | <b>0.002<sup>a</sup></b> |
| <i>Clostridium bartletti</i>        | 0.42 ± 0.39          | 0.63 ± 0.63             | 0.647 <sup>a</sup>       | 0.52 ± 0.09           | 0.22 ± 0.04          | 0.335 <sup>a</sup>       |
| <i>Clostridium glycolicum</i>       | 0.42 ± 0.28          | 0.55 ± 0.49             | 0.678 <sup>a</sup>       | 0.48 ± 0.39           | 0.31 ± 0.30          | <b>0.028<sup>a</sup></b> |
| <i>Coprococcus comes</i>            | 0.19 ± 0.20          | 0.37 ± 0.36             | 0.156 <sup>a</sup>       | 0.28 ± 0.29           | 0.27 ± 0.25          | 0.767 <sup>a</sup>       |
| <i>Eubacterium eligens</i>          | 1.76 ± 1.83          | 1.48 ± 1.53             | 0.561 <sup>a</sup>       | 1.68 ± 0.30           | 1.01 ± 1.01          | 0.171 <sup>a</sup>       |
| <i>Eubacterium ventriosum</i>       | 10.77 ± 9.20         | 8.60 ± 8.14             | 0.618 <sup>a</sup>       | 9.76 ± 8.64           | 12.58 ± 8.89         | 0.101 <sup>a</sup>       |
| <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | 6.60 ± 11.80         | 3.95 ± 5.60             | 0.982 <sup>a</sup>       | 5.36 ± 9.37           | 3.99 ± 7.69          | 0.735 <sup>a</sup>       |
| <i>Flavonifactor plautii</i>        | 0.95 ± 2.00          | 0.76 ± 1.03             | 0.802 <sup>a</sup>       | 0.86 ± 1.60           | 0.89 ± 0.89          | 0.111 <sup>a</sup>       |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>        | 0.29 ± 0.44          | 0.18 ± 0.42             | 0.498 <sup>a</sup>       | 0.24 ± 0.43           | 0.30 ± 0.41          | 0.350 <sup>a</sup>       |
| <i>Lactobacillus salivarius</i>     | 0.04 ± 0.07          | 0.52 ± 1.71             | 0.386 <sup>a</sup>       | 0.27 ± 1.17           | 0.03 ± 0.08          | 0.182 <sup>a</sup>       |
| <i>Roseburia hominis</i>            | 0.37 ± 0.40          | 0.10 ± 0.17             | <b>0.002<sup>a</sup></b> | 0.24 ± 0.34           | 0.49 ± 1.37          | 0.331 <sup>a</sup>       |
| <i>Trabulsiaella odonototermis</i>  | 0.63 ± 1.33          | 0.34 ± 0.55             | 0.483 <sup>a</sup>       | 0.49 ± 1.03           | 0.50 ± 0.65          | 0.366 <sup>a</sup>       |

The results are expressed as means ± SD. Statistically significant differences (indicated in bold):  $p < 0.05$  (<sup>a</sup>Mann–Whitney test, <sup>b</sup>independent sample t-test); comparison between \*ASD-diet and ASD-no diet, \*\*ASD group and TD group. ASD, autism spectrum disorder; ASD-diet, ASD children with gluten- and casein-free diet; ASD-no diet, ASD children without restricted diet; TD, typical development.

*longum* ( $p = 0.002$ ) and higher *Clostridium glycolicum* ( $p = 0.028$ ) than TD children.

In Table 2, the comparison of genus and species relative abundance between nutritional status (normal weight vs. excess weight) and neurodevelopment (ASD vs. TD) groups was studied by two-way ANCOVA. Children in the All group (ASD + TD) with excess weight had a lower relative abundance of *Roseburia* than normal weight ( $p = 0.012$ ). In addition, children with excess weight in the ASD group had a lower relative abundance of *Roseburia* ( $p = 0.005$ ) and *Faecalibacterium prausnitzii* ( $p = 0.038$ ) and a higher relative abundance of *Eubacterium ventriosum* ( $p = 0.019$ ) and *Flavonifractor plautii* ( $p = 0.043$ ) than those with excess weight in the TD group.

The relationship between the relative abundances of bacterial genus and species and children's dietary intake is shown in Figure 2. For the analysis, we applied unadjusted and adjusted (for age, GCFD/no diet and ASD/TD) models. Vegetable drink intake had an association with *Enterococcus* ( $n = 10$ ; unadjusted model:  $r = 0.640$ ,  $p = 0.046$ ), *Pseudomonas* ( $n = 9$ ; unadjusted:  $r = 0.671$ ,  $p = 0.048$ ), and *Sutterella* (unadjusted:  $n = 12$ ,  $r = -0.692$ ,  $p = 0.013$ ), which disappeared after adjustment for covariates; and a relationship with *Lactobacillus* was independent of age, GCFD/no diet, and ASD/TD ( $n = 13$ ; unadjusted:  $r = -0.683$ ,  $p = 0.010$ ; adjusted:  $r = -0.906$ ,  $p = 0.009$ ). Dairy intake ( $n = 43$ ) had an association with *Bacteroides* (unadjusted:  $r = 0.353$ ,  $p = 0.020$ ; adjusted:  $r = 0.435$ ,  $p = 0.048$ ) and *Bifidobacterium longum* (unadjusted:  $r = 0.503$ ,  $p = 0.001$ ; adjusted:  $r = 0.552$ ,  $p = 0.009$ ) that remained when the covariates were applied; it also had a relationship with *Bifidobacterium* (unadjusted:  $n = 43$ ,  $r = 0.320$ ,  $p = 0.036$ ) and *Prevotella* (unadjusted:  $n = 43$ ,  $r = -0.380$ ,  $p = 0.012$ ) which did not hold after adjustment. Cereals with gluten did not show a significant correlation with bacteria genus or species. However, cereals without gluten ( $n = 58$ ) had a relationship with *Alistipes* (unadjusted:  $r = -0.336$ ,  $p = 0.015$ ; adjusted:  $r = -0.373$ ,  $p = 0.024$ ), *Bifidobacterium longum* (unadjusted:  $r = -0.418$ ,  $p = 0.003$ ; adjusted:  $r = -0.537$ ,  $p = 0.006$ ), and *Clostridium glycolicum* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = 0.364$ ,  $p = 0.009$ ; adjusted:  $r = 0.374$ ,  $p = 0.021$ ), independent of confounding factors. They also had an association with *Bifidobacterium* ( $n = 56$ ; unadjusted:  $r = -0.290$ ,  $p = 0.041$ ), which disappeared after adjustment for covariates. In addition, the association between cereals with and without gluten intake and *Eubacterium eligens* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = -0.290$ ,  $p = 0.027$ ) and coconut oil intake with *Ruminococcus* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = -0.532$ ,  $p = 0.011$ ) disappeared after adjustment. The relationship between coconut oil intake and *Bacteroides intestinalis* ( $n = 58$  unadjusted:  $r = -0.891$ ,  $p = 0.001$ ; adjusted:  $r = -0.776$ ,  $p = 0.021$ ) and food source of fat ( $n = 58$ ) with *Clostridium glycolicum* (unadjusted:  $r = 0.442$ ,  $p = 0.001$ ; adjusted:  $r = -0.430$ ,  $p = 0.001$ ), *Eubacterium ventriosum* (unadjusted:  $r = 0.356$ ,  $p = 0.008$ ; adjusted:  $r = 0.518$ ,  $p = 0.004$ ), and *Flavonifractor plautii* (unadjusted:  $r = 0.325$ ,  $p = 0.026$ ; adjusted:  $r = 0.337$ ,  $p = 0.026$ ) was independent of confounding factors. Fish intake was associated with *Bacteroides intestinalis* ( $n = 28$ ; unadjusted:  $r = 0.582$ ,  $p = 0.023$ ) only in the model without adjustment. Food source of proteins had a relationship with *Faecalibacterium* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = -0.358$ ,  $p = 0.006$ ; adjusted:  $r = -0.349$ ,  $p = 0.007$ ), *Lactobacillus* ( $n = 49$ ;

unadjusted:  $r = -0.365$ ,  $p = 0.010$ ; adjusted:  $r = -0.398$ ,  $p = 0.005$ ), and *Lactobacillus reuteri* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = -0.363$ ,  $p = 0.044$ ; adjusted:  $r = -0.413$ ,  $p = 0.027$ ) in unadjusted and adjusted models, but the association with *Streptococcus* disappeared after considering potential confounders ( $n = 56$ ; unadjusted:  $r = -0.287$ ,  $p = 0.032$ ).

The association between bacteria genus and species and dietary intake in children with typical development is presented in Figure 3, where unadjusted and age-adjusted models were used. Dairy intake ( $n = 43$ ) had an association with *Alistipes* (unadjusted:  $r = 0.427$ ,  $p = 0.026$ ; adjusted:  $r = 0.509$ ,  $p = 0.022$ ), *Bacteroides* (unadjusted:  $r = 0.498$ ,  $p = 0.008$ ; adjusted:  $r = 0.584$ ,  $p = 0.007$ ), *Bifidobacterium ventriosum* (unadjusted:  $r = 0.388$ ,  $p = 0.046$ ; adjusted:  $r = 0.545$ ,  $p = 0.013$ ), *Bifidobacterium longum* (unadjusted:  $r = 0.544$ ,  $p = 0.004$ ; adjusted:  $r = 0.621$ ,  $p = 0.007$ ), and *Eubacterium ventriosum* (unadjusted:  $r = 0.541$ ,  $p = 0.004$ ; adjusted:  $r = 0.426$ ,  $p = 0.021$ ), independent of the age, but the association with *Prevotella* (unadjusted:  $r = -0.547$ ,  $p = 0.003$ ) disappeared after adjustment, and the relationship with *Sutterella* (adjusted:  $r = -0.459$ ,  $p = 0.045$ ) only appeared when the covariate was considered. Cereals with gluten had a relationship with *Lactobacillus* (unadjusted:  $n = 49$ ,  $r = 0.525$ ,  $p = 0.007$ ) that disappeared after adjusting, and with *Lactobacillus reuteri*, it was remained independent (unadjusted:  $n = 58$ ,  $r = 0.579$ ,  $p = 0.015$ , and adjusted:  $r = 0.532$ ,  $p = 0.047$ ). Cereals without gluten intake had an association with *Alistipes*, independent of age (unadjusted:  $n = 58$ ,  $r = -0.439$ ,  $p = 0.028$ ; adjusted:  $r = -0.456$ ,  $p = 0.028$ ), but the association with *Clostridium glycolicum* disappeared when considering the confounder (unadjusted:  $n = 58$ ,  $r = 0.402$ ,  $p = 0.047$ ). Food source of fat had an association with *Lactobacillus* ( $n = 49$ , unadjusted:  $r = -0.563$ ,  $p = 0.003$ ; adjusted:  $r = -0.508$ ,  $p = 0.004$ ), *Clostridium glycolicum* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = 0.546$ ,  $p = 0.003$ ; adjusted:  $r = 0.539$ ,  $p = 0.004$ ), *Eubacterium ventriosum* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = 0.407$ ,  $p = 0.035$ ; adjusted:  $r = 0.351$ ,  $p = 0.050$ ), and *Flavonifractor plautii* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = 0.487$ ,  $p = 0.016$ ; adjusted:  $r = 0.456$ ,  $p = 0.021$ ), which remained after adjusting. Fish had an association with *Bacteroides intestinalis* (unadjusted:  $n = 58$ ,  $r = 0.555$ ,  $p = 0.039$ ), but it disappeared after considering the age. No significant associations were found between bacteria genera or species and cereals with and without gluten, coconut oil, and food source of proteins.

The association between dietary intake and relative abundance of bacteria genus and species in children with ASD is shown in Figure 4. The analysis was unadjusted and adjusted for age and gluten- and casein-free diet/no diet. Vegetable drinks were associated with *Lactobacillus* in both models ( $n = 49$ , unadjusted:  $r = -0.620$ ,  $p = 0.042$ ; adjusted:  $r = -0.919$ ,  $p = 0.034$ ), but they were associated with *Sutterella* only without considering confounding factors ( $n = 49$ ; unadjusted:  $r = -0.645$ ,  $p = 0.032$ ). Intake of dairy, cereals with gluten, coconut oil, and food source of fat did not show a significant correlation with gut bacteria. Cereals without gluten had a correlation with *Faecalibacterium* which was kept after adjustment ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = 0.482$ ,  $p = 0.011$ ; adjusted:  $r = 0.470$ ,  $p = 0.040$ ). Cereals with and without gluten had an association with *Ruminococcus* ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = -0.388$ ,  $p = 0.034$ ), but it disappeared when

TABLE 2 Comparison of gut bacterial genus and species between nutritional status groups (normal weight vs. excess weight) and neurodevelopment groups (autism spectrum disorder vs. typical development) by two-way ANCOVA.

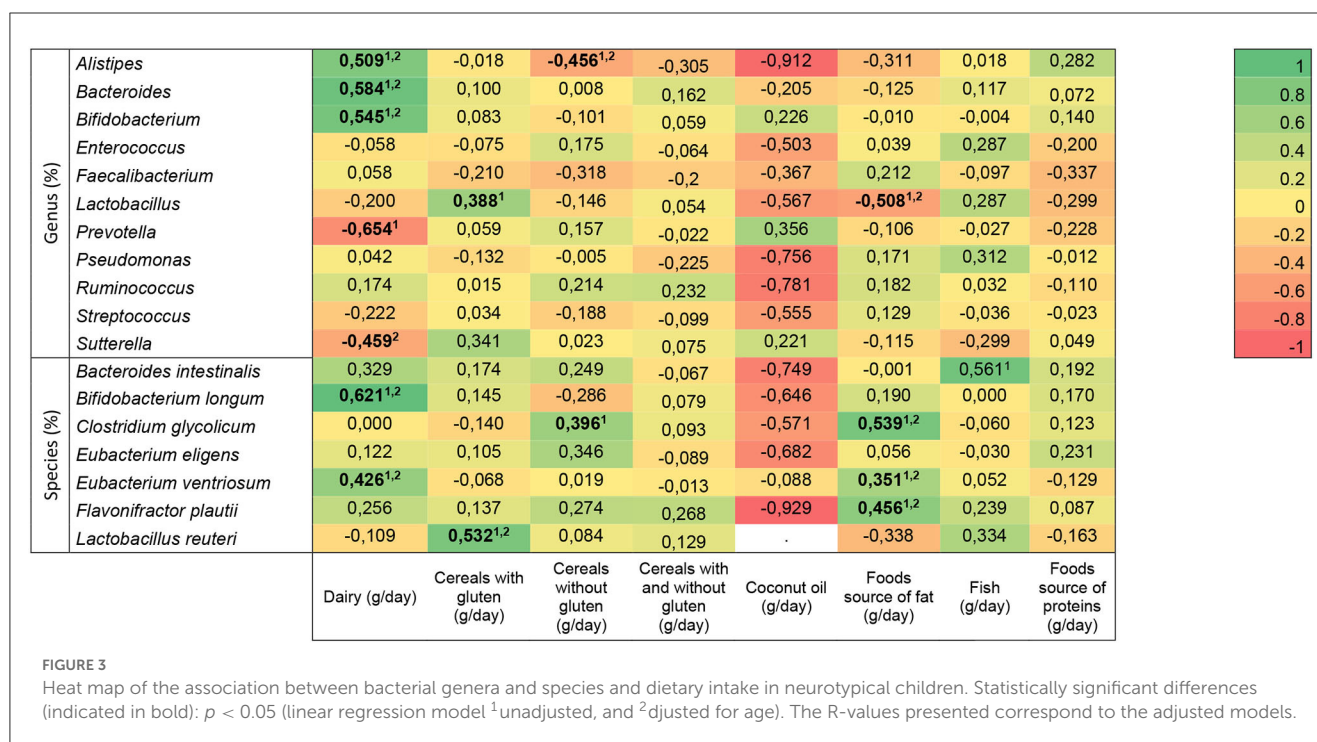
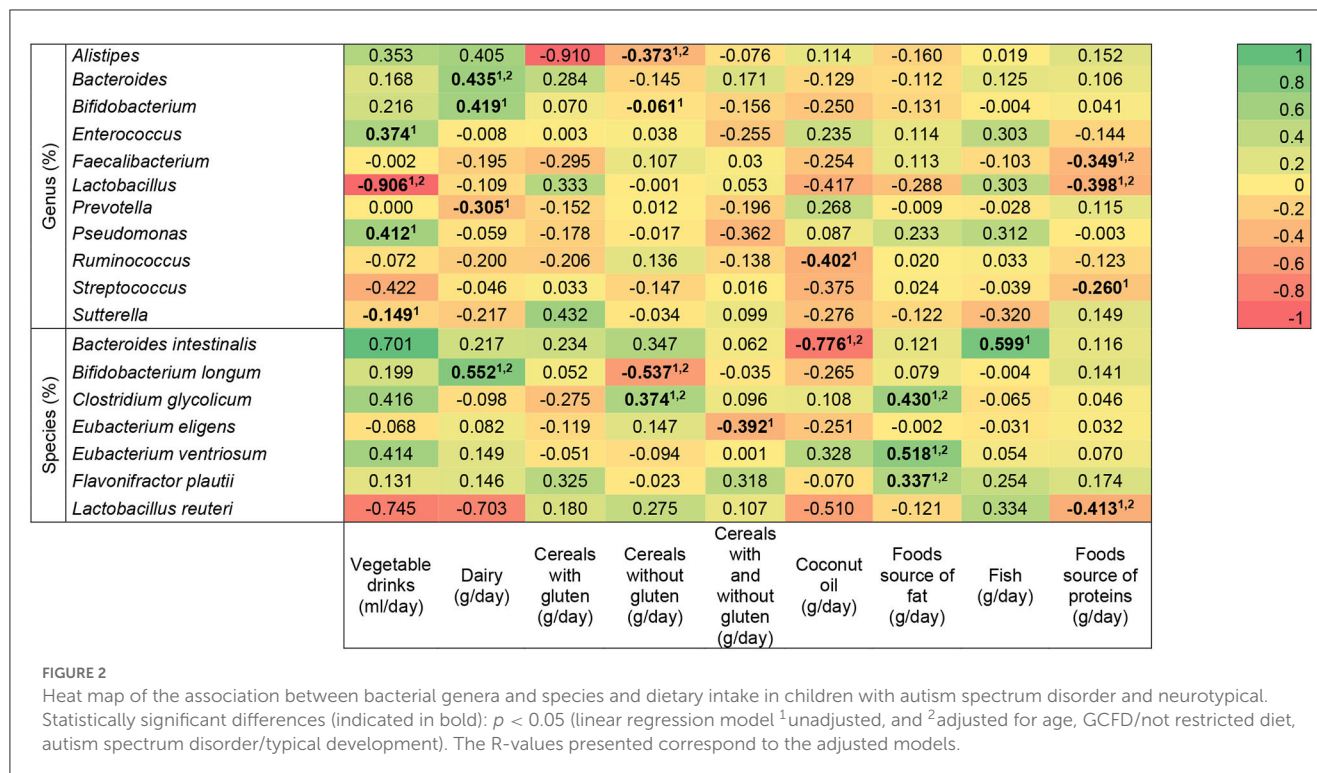
| Gut bacteria            | ASD group                         |                                               | TD group                          |                                               | All (ASD + TD)                    |                                                | Pair comparisons      |                       |                       |                       |                       |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                         | Normal weight<br>( <i>n</i> = 20) | Excess weight<br>(OW + OB)<br>( <i>n</i> = 9) | Normal weight<br>( <i>n</i> = 19) | Excess weight<br>(OW + OB)<br>( <i>n</i> = 9) | Normal weight<br>( <i>n</i> = 39) | Excess weight<br>(OW + OB)<br>( <i>n</i> = 18) | <i>p</i> <sup>a</sup> | <i>p</i> <sup>b</sup> | <i>p</i> <sup>c</sup> | <i>p</i> <sup>d</sup> | <i>p</i> <sup>e</sup> |
| Genus                   |                                   |                                               |                                   |                                               |                                   |                                                |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>Akkermansia</i>      | 1.12 ± 1.76                       | 2.52 ± 3.17                                   | 1.73 ± 2.54                       | 0.86 ± 0.90                                   | 1.42 ± 2.17                       | 1.69 ± 2.42                                    | 0.282                 | 0.812                 | 0.518                 | 0.956                 | 0.295                 |
| <i>Alistipes</i>        | 3.69 ± 2.85                       | 4.35 ± 4.03                                   | 4.84 ± 3.12                       | 3.16 ± 2.17                                   | 4.25 ± 3.00                       | 3.76 ± 3.20                                    | 0.215                 | 0.172                 | 0.997                 | 0.905                 | 0.051                 |
| <i>Bacteroides</i>      | 21.71 ± 10.19                     | 24.86 ± 10.30                                 | 25.72 ± 10.75                     | 21.78 ± 8.68                                  | 23.66 ± 10.52                     | 23.32 ± 9.38                                   | 0.325                 | 0.369                 | 0.902                 | 0.140                 | 0.697                 |
| <i>Bifidobacterium</i>  | 2.36 ± 2.59                       | 3.71 ± 4.13                                   | 3.73 ± 2.63                       | 3.11 ± 1.66                                   | 3.03 ± 2.67                       | 3.41 ± 3.07                                    | 0.565                 | 0.986                 | 0.655                 | 0.668                 | 0.871                 |
| <i>Blautia</i>          | 2.62 ± 1.36                       | 2.40 ± 0.31                                   | 2.86 ± 1.42                       | 2.21 ± 0.54                                   | 2.74 ± 1.37                       | 2.30 ± 0.44                                    | 0.892                 | 0.406                 | 0.646                 | 0.209                 | 0.841                 |
| <i>Clostridium</i>      | 7.21 ± 3.68                       | 6.29 ± 2.88                                   | 7.22 ± 2.99                       | 6.22 ± 4.11                                   | 7.22 ± 3.32                       | 6.25 ± 3.44                                    | 0.287                 | 0.275                 | 0.131                 | 0.671                 | 0.798                 |
| <i>Coprococcus</i>      | 0.88 ± 0.67                       | 0.52 ± 0.49                                   | 0.76 ± 0.72                       | 0.79 ± 0.65                                   | 0.82 ± 0.69                       | 0.66 ± 0.58                                    | 0.188                 | 0.509                 | 0.585                 | 0.645                 | 0.211                 |
| <i>Dialister</i>        | 0.90 ± 1.49                       | 1.01 ± 1.36                                   | 0.63 ± 0.72                       | 0.77 ± 0.95                                   | 0.76 ± 1.16                       | 0.89 ± 1.14                                    | 0.205                 | 0.438                 | 0.549                 | 0.571                 | 0.141                 |
| <i>Enterococcus</i>     | 0.46 ± 1.81                       | 0.10 ± 0.12                                   | 0.43 ± 0.99                       | 0.10 ± 0.13                                   | 0.45 ± 1.45                       | 0.10 ± 0.12                                    | 0.927                 | 0.235                 | 0.462                 | 0.251                 | 0.901                 |
| <i>Eubacterium</i>      | 3.47 ± 2.32                       | 2.49 ± 1.41                                   | 2.99 ± 1.89                       | 3.24 ± 2.47                                   | 3.24 ± 2.10                       | 2.87 ± 1.99                                    | 0.526                 | 0.882                 | 0.712                 | 0.625                 | 0.318                 |
| <i>Faecalibacterium</i> | 14.84 ± 7.58                      | 12.11 ± 4.38                                  | 15.14 ± 5.27                      | 15.11 ± 5.01                                  | 14.99 ± 6.48                      | 13.61 ± 4.82                                   | 0.596                 | 0.983                 | 0.706                 | 0.260                 | 0.197                 |
| <i>Lachnospirillum</i>  | 0.86 ± 0.84                       | 1.53 ± 1.15                                   | 0.83 ± 0.79                       | 0.80 ± 0.52                                   | 0.84 ± 0.81                       | 1.17 ± 0.94                                    | 0.192                 | 0.913                 | 0.371                 | 0.420                 | 0.567                 |
| <i>Lactobacillus</i>    | 0.94 ± 1.94                       | 0.60 ± 0.58                                   | 0.46 ± 0.59                       | 1.10 ± 2.07                                   | 0.71 ± 1.45                       | 0.85 ± 1.50                                    | 0.456                 | 0.461                 | 0.928                 | 0.172                 | 0.913                 |
| <i>Prevotella</i>       | 11.52 ± 12.36                     | 14.11 ± 11.79                                 | 6.67 ± 10.05                      | 7.36 ± 7.45                                   | 9.16 ± 11.41                      | 10.74 ± 10.18                                  | 0.402                 | 0.505                 | 0.287                 | 0.372                 | 0.392                 |
| <i>Pseudomonas</i>      | 0.52 ± 2.20                       | 0.07 ± 0.04                                   | 0.07 ± 0.06                       | 0.04 ± 0.03                                   | 0.30 ± 1.57                       | 0.06 ± 0.04                                    | 0.658                 | 0.367                 | 0.353                 | 0.654                 | 0.924                 |
| <i>Roseburia</i>        | 2.73 ± 2.21                       | 1.99 ± 1.09                                   | 2.82 ± 2.05                       | 3.03 ± 1.69                                   | 2.77 ± 2.11                       | 2.51 ± 1.48                                    | 0.965                 | 0.560                 | 0.671                 | <b>0.005</b>          | <b>0.012</b>          |
| <i>Ruminococcus</i>     | 2.37 ± 1.44                       | 2.87 ± 1.68                                   | 3.01 ± 1.46                       | 2.38 ± 1.00                                   | 2.68 ± 1.47                       | 2.62 ± 1.36                                    | 0.550                 | 0.434                 | 0.932                 | 0.193                 | 0.912                 |
| <i>Streptococcus</i>    | 1.56 ± 4.72                       | 0.83 ± 0.90                                   | 1.76 ± 1.94                       | 1.04 ± 1.00                                   | 1.66 ± 3.60                       | 0.94 ± 0.93                                    | 0.773                 | 0.831                 | 0.721                 | 0.708                 | 0.709                 |
| <i>Sutterella</i>       | 1.27 ± 1.48                       | 1.57 ± 2.41                                   | 1.37 ± 1.61                       | 2.66 ± 1.84                                   | 1.32 ± 1.53                       | 2.12 ± 2.15                                    | 0.732                 | 0.306                 | 0.750                 | 0.333                 | 0.745                 |
| <i>Turicibacter</i>     | 0.81 ± 1.09                       | 0.51 ± 0.74                                   | 0.61 ± 0.66                       | 0.44 ± 0.46                                   | 0.71 ± 0.90                       | 0.48 ± 0.60                                    | 0.593                 | 0.799                 | 0.568                 | 0.422                 | 0.750                 |

(Continued)

TABLE 2 (Continued)

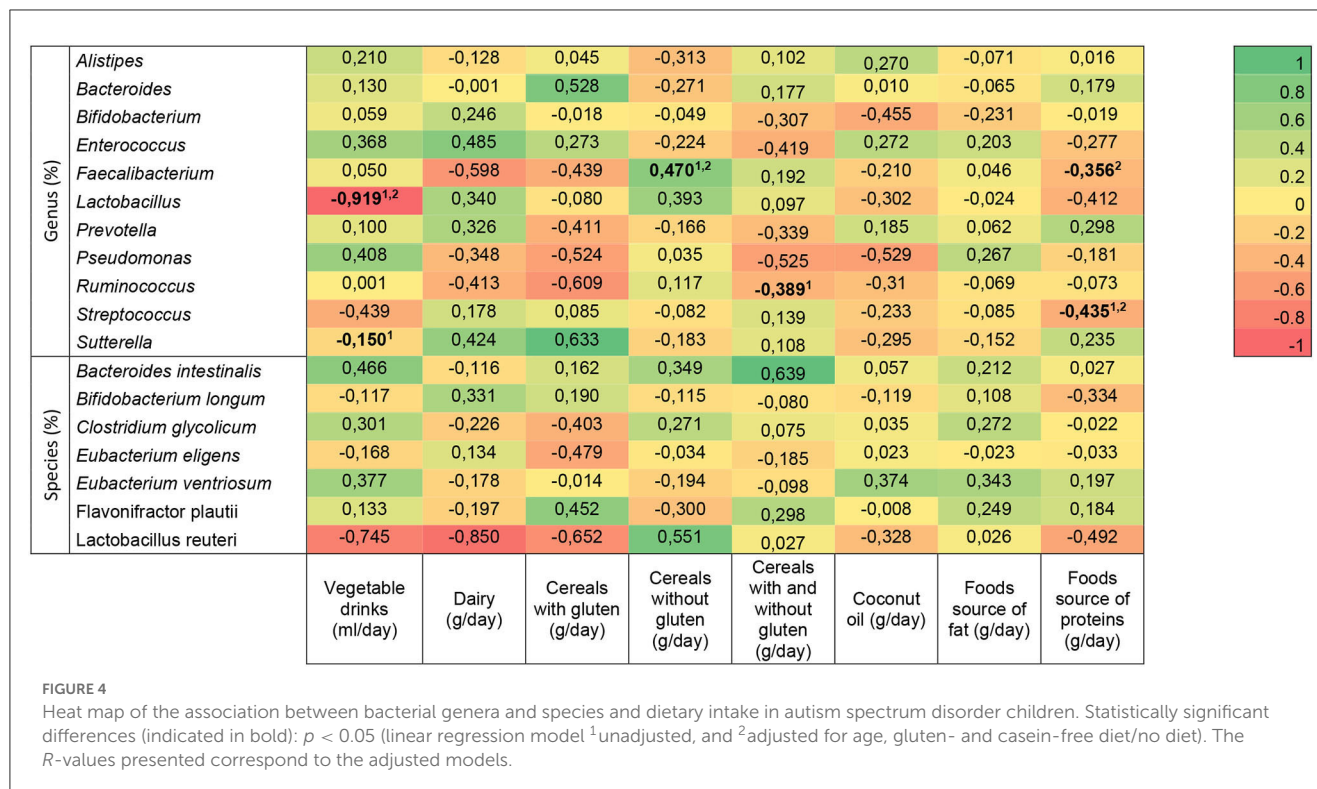
| Gut bacteria                        | ASD group                         |                                               | TD group                          |                                               | All (ASD + TD)                    |                                                | Pair comparisons      |                       |                       |                       |                       |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                                     | Normal weight<br>( <i>n</i> = 20) | Excess weight<br>(OW + OB)<br>( <i>n</i> = 9) | Normal weight<br>( <i>n</i> = 19) | Excess weight<br>(OW + OB)<br>( <i>n</i> = 9) | Normal weight<br>( <i>n</i> = 39) | Excess weight<br>(OW + OB)<br>( <i>n</i> = 18) | <i>p</i> <sup>a</sup> | <i>p</i> <sup>b</sup> | <i>p</i> <sup>c</sup> | <i>p</i> <sup>d</sup> | <i>p</i> <sup>e</sup> |
| Species                             |                                   |                                               |                                   |                                               |                                   |                                                |                       |                       |                       |                       |                       |
| <i>Akkermansia muciniphila</i>      | 0.97 ± 1.30                       | 3.08 ± 3.82                                   | 2.09 ± 3.02                       | 1.03 ± 1.14                                   | 1.51 ± 2.34                       | 2.06 ± 2.93                                    | 0.184                 | 0.619                 | 0.517                 | 0.634                 | 0.261                 |
| <i>Bacteroides fragilis</i>         | 0.96 ± 2.38                       | 0.45 ± 0.64                                   | 1.37 ±1.48                        | 0.86 ± 0.85                                   | 1.16 ± 1.98                       | 0.65 ± 0.76                                    | 0.804                 | 0.727                 | 0.681                 | 0.530                 | 0.646                 |
| <i>Bacteroides intestinalis</i>     | 0.02 ± 0.02                       | 0.19 ± 0.41                                   | 0.80 ± 2.94                       | 0.03 ± 0.03                                   | 0.34 ± 0.28                       | 0.26 ± 0.42                                    | 0.435                 | 0.274                 | 0.421                 | 0.381                 | 0.872                 |
| <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | 0.64 ± 1.15                       | 1.07 ± 2.25                                   | 0.54 ± 1.21                       | 0.89 ± 0.90                                   | 0.59 ± 1.16                       | 0.98 ± 1.66                                    | 0.612                 | 0.719                 | 0.545                 | 0.575                 | 0.539                 |
| <i>Bifidobacterium longum</i>       | 0.32 ± 0.45                       | 1.34 ± 3.39                                   | 1.45 ± 2.13                       | 0.71 ± 0.52                                   | 0.87 ± 1.60                       | 1.02 ± 2.37                                    | 0.640                 | 0.574                 | 0.473                 | 0.222                 | 0.350                 |
| <i>Clostridium bartletti</i>        | 0.50 ± 0.57                       | 0.56 ± 0.46                                   | 0.34 ± 0.26                       | 0.26 ± 0.10                                   | 0.42 ± 0.44                       | 0.411 ± 0.35                                   | 0.641                 | 0.793                 | 0.867                 | 0.696                 | 0.382                 |
| <i>Clostridium glycolicum</i>       | 0.42 ± 0.34                       | 0.63 ± 0.49                                   | 0.33 ± 0.34                       | 0.26 ± 0.22                                   | 0.38 ± 0.34                       | 0.45 ± 0.41                                    | 0.546                 | 0.748                 | 0.817                 | 0.319                 | 0.140                 |
| <i>Coprococcus comes</i>            | 0.33 ± 0.33                       | 0.18 ± 0.18                                   | 0.28 ± 0.28                       | 0.27 ± 0.19                                   | 0.311 ± 0.30                      | 0.22 ± 0.19                                    | 0.511                 | 0.786                 | 0.496                 | 0.304                 | 0.699                 |
| <i>Eubacterium eligens</i>          | 1.76 ± 1.93                       | 1.47 ± 1.06                                   | 1.09 ± 1.13                       | 0.86 ± 0.70                                   | 1.43 ± 1.61                       | 1.17 ± 0.93                                    | 0.410                 | 0.658                 | 0.755                 | 0.780                 | 0.418                 |
| <i>Eubacterium ventriosum</i>       | 7.91 ± 9.51                       | 12.74 ± 4.95                                  | 13.60 ± 9.06                      | 10.42 ± 8.61                                  | 10.68 ± 9.61                      | 11.58 ± 6.92                                   | 0.064                 | 0.415                 | 0.414                 | <b>0.019</b>          | 0.719                 |
| <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | 7.98 ± 10.60                      | 0.13 ± 0.34                                   | 3.07 ± 6.55                       | 5.93 ± 9.38                                   | 5.59 ± 9.10                       | 3.03 ± 7.38                                    | 0.294                 | 0.994                 | 0.395                 | <b>0.038</b>          | 0.774                 |
| <i>Flavonifactor plautii</i>        | 0.32 ± 0.49                       | 1.26 ± 1.18                                   | 0.89 ± 0.79                       | 0.89 ± 1.14                                   | 0.60 ± 0.70                       | 1.07 ± 1.14                                    | 0.223                 | 0.295                 | 0.846                 | <b>0.043</b>          | 0.915                 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>        | 0.11 ± 0.27                       | 0.50 ± 0.59                                   | 0.30 ± 0.45                       | 0.30 ± 0.35                                   | 0.20 ± 0.38                       | 0.40 ± 0.48                                    | 0.696                 | 0.773                 | 0.624                 | 0.464                 | 0.502                 |
| <i>Lactobacillus salivarius</i>     | 0.39 ± 1.43                       | 0.01 ± 0.04                                   | 0.02 ± 0.79                       | 0.06 ± 0.09                                   | 0.21 ± 1.03                       | 0.03 ± 0.07                                    | 0.637                 | 0.422                 | 0.966                 | 0.218                 | 0.847                 |
| <i>Roseburia hominis</i>            | 0.27 ± 0.38                       | 0.21 ± 0.26                                   | 0.51 ± 1.62                       | 0.45 ± 0.62                                   | 0.38 ± 1.16                       | 0.33 ± 0.48                                    | 0.944                 | 0.756                 | 0.867                 | 0.144                 | 0.141                 |
| <i>Trabulsiella odonototermitis</i> | 0.50 ± 1.21                       | 0.45 ± 0.63                                   | 0.60 ± 0.71                       | 0.28 ± 0.46                                   | 0.55 ± 0.99                       | 0.36 ± 0.54                                    | 0.541                 | 0.355                 | 0.287                 | 0.864                 | 0.723                 |

The results are expressed as means ± SD. Statistically significant differences (indicated in bold, *p* < 0.05; adjusted for age, birth weight, GCFD/not restricted diet): (a) Two-way ANCOVA, comparisons between <sup>a</sup>normal and excess weight in the ASD group, <sup>b</sup>normal and excess weight in the TD group, <sup>c</sup>normal weight in ASD and TD, <sup>d</sup>excess weight in ASD and TD; (b) one-way ANCOVA, comparison between <sup>c</sup>normal weight and excess weight in all participants. ASD, autism spectrum disorder; TD, typical development; OW, overweight; OB, obesity.



potential confounders were considered. The association between food source of proteins and *Faecalibacterium* was observed only when considering the covariates ( $n = 58$ ; adjusted:  $r = -0.356$ ,  $p = 0.049$ ); with *Streptococcus*, the relationship was found in unadjusted and adjusted models ( $n = 58$ ; unadjusted:  $r = -0.437$ ,  $p = 0.020$ ; adjusted:  $r = -0.435$ ,  $p = 0.023$ ).

Table 3 shows the comparison of gut bacterial genus and species between dietary intake groups, categorized by the 50th percentile, in children with TD and ASD without a GCFD by means of two-way ANOVA. Children with ASD-no diet and a dairy intake of  $>334.3$  g/day had a higher relative abundance of *Lactobacillus* ( $p = 0.025$ ) and *Streptococcus* ( $p = 0.003$ ) than those with an intake



of  $\leq 334.3$  g/day. In the TD group with a dairy intake of  $> 334.3$  g/day, a greater amount of *Alistipes* ( $p = 0.013$ ) and *Eubacterium ventriosum* ( $p = 0.024$ ) was found as compared with children with a lower dairy intake. When gut bacteria were compared between TD and ASD-no diet children in the dairy intake of  $> 334.3$  g/day group, we observed a lower relative abundance of *Faecalibacterium* ( $p = 0.005$ ) and a higher one of *Lactobacillus* ( $p = 0.012$ ) and *Streptococcus* ( $p = 0.009$ ) in ASD-no diet children. In relation to cereals with gluten, *Faecalibacterium* was higher ( $p = 0.042$ ) in ASD-no diet children with an intake of  $> 198.35$  g/day than TD with the same intake. ASD-no diet children with an intake of cereals without gluten  $\leq 7.12$  g/day had higher *Flavonifractor plautii* ( $p = 0.013$ ) than those with an intake of  $> 7.12$  g/day. In addition, in the group with an intake of cereal without gluten  $> 7.12$  g/day, *Flavonifractor plautii* ( $p = 0.014$ ) and *Eubacterium ventriosum* ( $p = 0.017$ ) were higher in TD children than in ASD-no diet. Regarding food source of fat, when the intake was  $> 25$  g/day, the abundance of *Faecalibacterium* was higher in TD children than in ASD-no diet ( $p = 0.031$ ).

Table 4 shows the comparison of gut bacterial genus and species between dietary intake groups categorized by the 50th percentile in children with ASD and a GCFD. *Alistipes* was higher ( $p = 0.002$ ), and *Lactobacillus* was lower ( $p = 0.004$ ) in the  $> 309.5$  ml/day vegetable drink intake group than in children with an intake of  $\leq 309.5$  ml/day. Higher levels of *Faecalibacterium* ( $p = 0.045$ ) were found in individuals who consume  $> 102.46$  g/day of cereals without gluten compared with those with lower intake. No significant difference was found when comparing gut bacteria between the higher and the lower intake of food source of proteins.

## Discussion

In this study, differences were observed in the composition of fecal bacteria as per nutritional status and dietary intake in ASD and TD children. Several studies have shown different gut bacteria compositions in children with ASD as compared with TD (25). In contrast, we have not found significant differences at the genus level, but at the species level, we observed lower abundances of *Bifidobacterium longum* and higher abundances of *Clostridium glycolicum* in ASD than in the TD group. Wang et al. (26) reported lower levels of *Bifidobacterium* spp. and *Akkermansia muciniphila* in children with autism compared with TD ones, but in our study, no significant difference was observed in the abundance of this mucolytic bacterium. Our findings are in line with previous studies that found decreased *Bifidobacterium* spp. and elevated *Clostridium* spp. in ASD as compared with controls and suggested that the latter bacterium is a determinant of the risk of autism (12, 27, 28). Research conducted in 1998 hypothesized that ASD could be due to a dysbiosis context with colonization by *Clostridium tetani* and to its neurotoxic effects in neurons producing gamma-aminobutyric acid (inhibitory neurotransmitter of the central nervous system) (29, 30). Another study shows a positive correlation between *Clostridium* cluster XVIII and gastrointestinal symptoms such as constipation in autistic and neurotypical subjects (27, 31).

Interestingly, in the ASD-diet group, *Bifidobacterium* (B.) were significantly lower compared with the ASD-no diet group, and this bacteria had a positive association with dairy intake and a negative association with cereals without gluten in the All (ASD + TD) group. A greater abundance of *Bifidobacterium* has been described as having beneficial effects on health since it inhibits pathogen

**TABLE 3** Comparison of gut bacterial genus and species between dietary intake groups (categorized by the 50th percentile) in children with typical development and autism spectrum disorder without diet by means of two-way ANOVA.

| Gut bacteria                  | ASD-no diet group              |                                   | TD group                       |                                 | ASD-no diet group           |                                | TD group                   |                                 | ASD-no diet group              |                                | TD group                 |                                 | ASD-no diet group           |                                 | TD group                  |                                 |
|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
|                               | Dairy (g/day)                  |                                   |                                |                                 | Cereals with gluten (g/day) |                                |                            |                                 | Cereals without gluten (g/day) |                                |                          |                                 | Foods source of fat (g/day) |                                 |                           |                                 |
|                               | <334.3<br>( <i>n</i> = 11)     | >334.3<br>( <i>n</i> = 3)         | <334.3<br>( <i>n</i> = 10)     | >334.3<br>( <i>n</i> = 18)      | <198.3<br>( <i>n</i> = 9)   | >198.3<br>( <i>n</i> = 5)      | <198.3<br>( <i>n</i> = 13) | >198.3<br>( <i>n</i> = 15)      | <7.1<br>( <i>n</i> = 8)        | >7.1<br>( <i>n</i> = 6)        | <7.1<br>( <i>n</i> = 13) | >7.1<br>( <i>n</i> = 15)        | <25.0<br>( <i>n</i> = 7)    | >25.0<br>( <i>n</i> = 7)        | <25.0<br>( <i>n</i> = 14) | >25.0<br>( <i>n</i> = 14)       |
| Genus                         |                                |                                   |                                |                                 |                             |                                |                            |                                 |                                |                                |                          |                                 |                             |                                 |                           |                                 |
| <i>Alistipes</i>              | 4.07 ± 2.81                    | 5.67 ± 6.52                       | <b>2.70 ± 1.87<sup>b</sup></b> | <b>5.19 ± 3.05<sup>b</sup></b>  | 4.19 ± 3.00                 | 4.81 ± 4.91                    | 4.63 ± 2.50                | 4.01 ± 3.30                     | 4.28 ± 4.00                    | 4.65 ± 3.22                    | 5.06 ± 3.13              | 2.93 ± 1.96                     | 4.98 ± 4.11                 | 3.85 ± 3.26                     | 4.85 ± 3.00               | 3.75 ± 2.84                     |
| <i>Bacteroides</i>            | 21.57 ± 8.88                   | 20.56 ± 1.23                      | 22.24 ± 11.41                  | 25.68 ± 9.48                    | 20.74 ± 7.52                | 22.45 ± 9.12                   | 22.97 ± 6.37               | 25.74 ± 12.64                   | 3.91 ± 3.40                    | 4.79 ± 3.95                    | 5.06 ± 3.07              | 3.64 ± 2.71                     | 21.34 ± 6.80                | 21.36 ± 9.28                    | 26.76 ± 11.47             | 22.14 ± 8.40                    |
| <i>Bifidobacterium</i>        | 4.58 ± 3.99                    | 2.87 ± 1.48                       | 2.26 ± 1.59                    | 4.24 ± 2.44                     | 5.34 ± 4.04                 | 2.19 ± 1.46                    | 4.06 ± 2.15                | 3.08 ± 2.49                     | 3.82 ± 3.60                    | 4.74 ± 3.92                    | 4.16 ± 2.57              | 2.99 ± 2.08                     | 3.66 ± 3.21                 | 4.77 ± 4.18                     | 3.36 ± 2.16               | 3.71 ± 2.59                     |
| <i>Faecalibacterium</i>       | 13.12 ± 4.04                   | <b>6.55 ± 2.55<sup>c</sup></b>    | 14.14 ± 5.02                   | <b>15.68 ± 5.19<sup>c</sup></b> | 12.88 ± 4.42                | <b>9.60 ± 4.67<sup>c</sup></b> | 15.58 ± 4.12               | <b>14.74 ± 5.93<sup>c</sup></b> | 12.27 ± 4.83                   | 10.96 ± 4.67                   | 16.20 ± 6.15             | 14.20 ± 3.95                    | 12.08 ± 4.85                | <b>11.34 ± 4.74<sup>c</sup></b> | 13.97 ± 5.57              | <b>16.29 ± 4.46<sup>c</sup></b> |
| <i>Lactobacillus</i>          | <b>0.50 ± 0.41<sup>a</sup></b> | <b>2.96 ± 5.10<sup>a,c</sup></b>  | 1.24 ± 2.00                    | <b>0.35 ± 0.34<sup>c</sup></b>  | 0.51 ± 0.44                 | 1.95 ± 3.86                    | 0.78 ± 1.76                | 0.57 ± 0.63                     | 0.40 ± 0.41                    | 1.86 ± 3.45                    | 0.94 ± 1.74              | 0.43 ± 0.61                     | 0.44 ± 0.43                 | 1.61 ± 3.21                     | 0.99 ± 1.73               | 0.35 ± 0.35                     |
| <i>Streptococcus</i>          | <b>0.86 ± 0.89<sup>a</sup></b> | <b>7.43 ± 12.22<sup>a,c</sup></b> | 0.78 ± 0.53                    | <b>1.95 ± 2.00<sup>c</sup></b>  | 1.02 ± 0.92                 | 4.53 ± 9.51                    | 2.18 ± 2.07                | 0.97 ± 1.13                     | 4.26 ± 8.50                    | 0.78 ± 0.91                    | 1.97 ± 2.19              | 1.15 ± 1.10                     | 0.81 ± 0.96                 | 3.73 ± 7.88                     | 1.13 ± 1.53               | 1.93 ± 1.85                     |
| <i>Suterella</i>              | 2.33 ± 2.14                    | 1.38 ± 1.29                       | 2.36 ± 1.73                    | 1.46 ± 1.75                     | 1.73 ± 1.72                 | 2.85 ± 2.43                    | 1.88 ± 2.05                | 1.69 ± 1.54                     | 1.92 ± 2.25                    | 2.40 ± 1.73                    | 1.63 ± 1.72              | 1.91 ± 1.85                     | 1.43 ± 1.36                 | 2.82 ± 2.36                     | 1.47 ± 1.79               | 2.09 ± 1.74                     |
| Species                       |                                |                                   |                                |                                 |                             |                                |                            |                                 |                                |                                |                          |                                 |                             |                                 |                           |                                 |
| <i>Bifidobacterium longum</i> | 1.29 ± 3.01                    | 0.47 ± 0.15                       | 0.47 ± 0.50                    | 1.62 ± 2.12                     | 1.51 ± 3.32                 | 0.39 ± 0.23                    | 1.22 ± 1.93                | 1.20 ± 1.75                     | 0.34 ± 0.26                    | 2.14 ± 4.02                    | 1.37 ± 1.81              | 1.07 ± 1.84                     | 0.45 ± 0.25                 | 1.78 ± 3.78                     | 0.68 ± 0.52               | 1.74 ± 2.42                     |
| <i>Clostridium glycolicum</i> | 0.49 ± 0.50                    | 0.78 ± 0.45                       | 0.25 ± 0.21                    | 0.34 ± 0.35                     | 0.63 ± 0.56                 | 0.41 ± 0.31                    | 0.37 ± 0.38                | 0.26 ± 0.22                     | 0.43 ± 0.26                    | 0.71 ± 0.68                    | 0.22 ± 0.21              | 0.39 ± 0.36                     | 0.47 ± 0.37                 | 0.64 ± 0.60                     | 0.23 ± 0.22               | 0.39 ± 0.36                     |
| <i>Eubacterium ventriosum</i> | 9.57 ± 8.76                    | 5.04 ± 4.80                       | <b>5.76 ± 7.79<sup>b</sup></b> | <b>16.36 ± 7.13<sup>b</sup></b> | 9.60 ± 8.82                 | 6.82 ± 7.31                    | 14.95 ± 8.35               | 10.52 ± 9.10                    | 10.76 ± 8.64                   | <b>5.73 ± 7.11<sup>c</sup></b> | 11.50 ± 10.21            | <b>13.51 ± 7.81<sup>c</sup></b> | 8.20 ± 9.63                 | 9.01 ± 7.10                     | 10.83 ± 9.08              | 14.33 ± 8.66                    |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>  | 0.22 ± 0.47                    | 0.01 ± 0.03                       | 0.14 ± 0.33                    | 0.38 ± 0.43                     | 0.25 ± 0.52                 | 0.04 ± 0.08                    | 0.27 ± 0.32                | 0.32 ± 0.49                     | 0.31 ± 0.53                    | 0.00 ± 0.01                    | 0.35 ± 0.50              | 0.25 ± 0.33                     | 0.24 ± 0.57                 | 0.12 ± 0.23                     | 0.35 ± 0.45               | 0.24 ± 0.38                     |
| <i>Flavonifactor plautii</i>  | 0.73 ± 1.03                    | 0.86 ± 1.24                       | 0.38 ± 0.49                    | 1.18 ± 0.95                     | 0.67 ± 1.10                 | 0.91 ± 0.97                    | 1.11 ± 0.91                | 0.70 ± 0.86                     | <b>1.27 ± 1.12<sup>a</sup></b> | <b>0.08 ± 0.11<sup>a</sup></b> | 0.71 ± 0.89              | 1.05 ± 0.90                     | 0.68 ± 0.84                 | 0.83 ± 1.25                     | 0.69 ± 0.56               | 1.10 ± 1.12                     |

The results expressed as means ± SD. Statistically significant differences (indicated in bold,  $p < 0.05$ ): Two-way ANOVA, comparisons between <sup>a</sup>lower and higher dietary intake groups in the ASD-no diet children; <sup>b</sup>lower and higher dietary intake groups in TD children; <sup>c</sup>ASD-no diet and TD children in the higher dietary intake group. ASD-no diet, children with autism spectrum disorder without a restricted diet; TD, typical development.

**TABLE 4** Comparison of gut bacterial genus and species between dietary intake groups (categorized by the 50th percentile) in children with autism spectrum disorder and a gluten- and casein-free diet.

| Gut bacteria                  | Vegetable drinks (ml/day) |                      |                          | Cereals without gluten (g/day) |                      |                          | Foods source of proteins (g/day) |                      |                    |
|-------------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------------|----------------------|--------------------|
|                               | $\leq 309.5$<br>(n = 8)   | $> 309.5$<br>(n = 8) | p                        | $\leq 102.4$<br>(n = 8)        | $> 102.4$<br>(n = 8) | p                        | $\leq 183.6$<br>(n = 8)          | $> 183.6$<br>(n = 8) | p                  |
| <b>Genus</b>                  |                           |                      |                          |                                |                      |                          |                                  |                      |                    |
| <i>Alistipes</i>              | 1.56 ± 1.11               | 5.64 ± 2.51          | <b>0.002<sup>a</sup></b> | 2.69 ± 2.46                    | 4.51 ± 3.01          | 0.327 <sup>a</sup>       | 3.60 ± 3.41                      | 3.60 ± 2.32          | 0.860 <sup>a</sup> |
| <i>Bacteroides</i>            | 22.72 ± 8.34              | 25.24 ± 14.77        | 0.111 <sup>a</sup>       | 24.13 ± 12.24                  | 23.82 ± 11.91        | 0.559 <sup>a</sup>       | 22.44 ± 5.66                     | 25.51 ± 15.94        | 0.826 <sup>a</sup> |
| <i>Bifidobacterium</i>        | 2.15 ± 2.28               | 0.73 ± 0.79          | 0.156 <sup>b</sup>       | 2.01 ± 2.35                    | 0.86 ± 0.84          | 0.275 <sup>b</sup>       | 1.36 ± 0.91                      | 1.52 ± 2.48          | 0.936 <sup>b</sup> |
| <i>Faecalibacterium</i>       | 14.90 ± 4.60              | 17.77 ± 10.02        | 0.458 <sup>a</sup>       | 12.59 ± 6.12                   | 20.08 ± 7.54         | <b>0.045<sup>a</sup></b> | 16.72 ± 3.84                     | 15.95 ± 10.55        | 0.862 <sup>b</sup> |
| <i>Lactobacillus</i>          | 1.06 ± 0.67               | 0.22 ± 0.22          | <b>0.004<sup>b</sup></b> | 0.64 ± 0.75                    | 0.64 ± 0.58          | 0.925 <sup>b</sup>       | 0.94 ± 0.56                      | 0.34 ± 0.62          | 0.062 <sup>b</sup> |
| <i>Streptococcus</i>          | 0.60 ± 0.31               | 0.38 ± 0.33          | 0.476 <sup>b</sup>       | 0.47 ± 0.38                    | 0.51 ± 0.30          | 0.476 <sup>b</sup>       | 0.60 ± 0.32                      | 0.38 ± 0.32          | 0.090 <sup>b</sup> |
| <i>Sutterella</i>             | 1.12 ± 1.61               | 0.11 ± 0.14          | 0.108 <sup>b</sup>       | 1.11 ± 1.61                    | 0.12 ± 0.15          | 0.124 <sup>b</sup>       | 0.89 ± 1.60                      | 0.34 ± 0.68          | 0.372 <sup>b</sup> |
| <b>Species</b>                |                           |                      |                          |                                |                      |                          |                                  |                      |                    |
| <i>Bifidobacterium longum</i> | 0.31 ± 0.67               | 0.15 ± 0.23          | 0.923 <sup>a</sup>       | 0.37 ± 0.68                    | 0.09 ± 0.12          | 0.511 <sup>a</sup>       | 0.16 ± 0.23                      | 0.30 ± 0.68          | 0.772 <sup>a</sup> |
| <i>Clostridium glycolicum</i> | 0.39 ± 0.27               | 0.45 ± 0.30          | 0.937 <sup>b</sup>       | 0.30 ± 0.23                    | 0.54 ± 0.28          | 0.147 <sup>b</sup>       | 0.51 ± 0.29                      | 0.34 ± 0.26          | 0.310 <sup>b</sup> |
| <i>Eubacterium ventriosum</i> | 9.08 ± 8.10               | 12.46 ± 10.46        | 0.330 <sup>b</sup>       | 9.10 ± 7.70                    | 12.44 ± 10.76        | 0.401 <sup>b</sup>       | 10.42 ± 8.91                     | 11.11 ± 10.09        | 0.943 <sup>b</sup> |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>  | 0.45 ± 0.56               | 0.13 ± 0.20          | 0.169 <sup>b</sup>       | 0.21 ± 0.27                    | 0.37 ± 0.57          | 0.430 <sup>b</sup>       | 0.49 ± 0.54                      | 0.09 ± 0.18          | 0.059 <sup>b</sup> |
| <i>Flavonifractor plautii</i> | 0.72 ± 0.88               | 1.18 ± 2.78          | 0.311 <sup>b</sup>       | 1.44 ± 2.72                    | 0.46 ± 0.82          | 0.511 <sup>b</sup>       | 1.45 ± 2.78                      | 0.46 ± 0.59          | 0.251 <sup>b</sup> |

The results are expressed as means ± SD. Statistically significant differences (indicated in bold):  $p < 0.05$  (<sup>a</sup>t-test, <sup>b</sup>Mann-Whitney test).

growth by releasing bacteriocins (32, 33), and an increase in *B. longum* can mitigate depression in patients with irritable bowel syndrome through changes in the brain areas involved in mood regulation (34).

In line with our results, a study in adults shows a significant association between gluten-free diet and a reduced relative abundance of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (*L.*) (35). Importantly, both genera synthesize short-chain fatty acids, that interact with receptors in the gut mucosa and contribute to mucus maintenance, have an antimicrobial effect on pathogens and can reverse leaky gut disorders (36). Therefore, the assumption is that greater abundances of *Lactobacillus* in the gut are associated with a higher intake of dairy (37). In the present study, we also observed that children with ASD-no diet and a dairy intake of  $> 334.3$  g/day had a higher mean of *Lactobacillus* than those with a lower intake. On the contrary, the ASD-diet group with an intake of  $> 309.5$  ml/day of vegetable drinks had a lower abundance of this genus than children with an intake of  $\leq 309.5$  ml/day. Considering all participants, the intake of vegetable drinks and food source of proteins had a negative association with *Lactobacillus* and *L. reuteri*, respectively. This last bacterial species was found to reverse social deficits in experimental animals with ASD (38).

Apart from that, vegetable drink intake also had a positive association with the facultative anaerobe *Enterococcus* and a negative association with *Sutterella* in all children only in the unadjusted model. In relation to this, Mangiola et al. (39) have

reported a positive association between *Sutterella* genus and the development of autism in children. Nevertheless, an increase in *Enterococcus* has been detected in fecal samples from patients with diarrhea (40). In addition, a pro-inflammatory bacteria named *Alistipes* (41) was higher in ASD-diet children with an intake of  $> 309.5$  ml/day of vegetable drinks than those with a lower intake, but it was also higher in children with TD and a dairy intake of  $> 334.3$  g/day than in those with a dairy intake of  $\leq 334.3$  g/day, and a positive association between *Alistipes* and dairy intake was observed in this group. Additionally, in All and TD groups, this bacterium was inversely related to cereals without gluten. Another bacterium with anti-inflammatory properties called *Prevotella* (42) had a negative association (only in the unadjusted model) with dairy intake considering All and TD children.

In relation to nutritional status, participants in the All group with excess weight had a lower relative abundance of a beneficial butyrate-producing bacterium called *Roseburia* (*R.*) (43) than the normal weight ones, and *Roseburia* and *R. hominis* were higher in the ASD-diet as compared with the ASD-no diet group. In addition, children with excess weight in the ASD group had a significantly lower relative abundance of *Roseburia* and *Faecalibacterium prausnitzii* and a higher relative abundance of *Eubacterium ventriosum* and *Flavonifractor plautii* than those with excess weight in the TD group. A study performed in Japan showed that *E. ventriosum* was significantly associated with obese subjects (44). Moreover, a significantly reduced abundance of this

species was described in people with colorectal cancer and could be considered a risk biomarker for the illness (45). On the other hand, *Faecalibacterium prausnitzii* is responsible for degrading mucin-producing butyrate and peptides that inhibit the NF- $\kappa$ B pathway in intestinal epithelial cells with an anti-inflammatory effect, and it has been associated with a reduced abundance in obesity (46, 47).

It has recently been reported that eating bread made from transgenic low-gliadin wheat produces a significantly higher abundance of *Faecalibacterium* and *Roseburia* genera with potentially beneficial changes in the composition of the intestinal microbiota, due to the increase in butyrate, which maintains good gut permeability (48). In our study, considering the ASD group, cereals without gluten also had a positive correlation with *Faecalibacterium*. Additionally, we observed that the ASD-diet group had a significantly higher level of *Faecalibacterium* in individuals who consume >102.46 g/day of cereals without gluten as compared with those with lower intake. It is worth mentioning that Jiang et al. (49) observed a negative correlation between *Faecalibacterium* abundances and the severity of depressive manifestation and overexpression of *Alistipes* in this psychiatric disorder.

In relation to cereal intake, other studies have shown that a high carbohydrate intake was associated with higher abundances of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in fecal samples (50). In our study, the TD group precisely had a positive relationship between the intake of cereals with gluten and the abundances of *Lactobacillus* and *L. reuteri*. Apart from that, by comparison, children with TD and an intake of >7.12 g/day of cereals without gluten had higher abundances of *Flavonifractor (F.) plautii* than the ASD-no diet group with the same food intake, and in this last group, those with an intake of  $\leq$ 7.12 g/day had more *F. plautii* than children with an intake of >7.12 g/day. Mikami et al. (51) have recently reported that an increased abundance of this bacterium has a beneficial effect as a modulator of gut inflammation, mediating IL-17 suppression in animals.

A number of studies have reported that an animal-based diet with high protein and fat intake seems to increase bile-tolerant bacteria called *Bacteroides* and could boost intestinal bowel disease risk (15, 52). Consistent with the said finding, we found that fish intake was positively associated with *Bacteroides intestinalis* in All and TD children (without adjustment for potential confounders). Even so, an investigation with mice fed with fish oil for 11 weeks described that, due to the interaction with the gut microbiota, there was less white adipose tissue inflammation and Toll-like receptor activation as compared with the lard diet (53). However, another research shows that in humans, salmon consumption has no effect on gut microbiota of pregnant women (54).

Regarding the intake of food source of fat, a comparison study showed that rats on a diet rich in coconut oil for 2 weeks had a lower abundance of *Ruminococcus flavefaciens* than those fed with soy oil (55). Along those lines, our study has found a negative association between coconut oil intake and *Ruminococcus* (unadjusted model) and *Bacteroides intestinalis* in the All group. In addition, a meta-analysis shows 11 trials with a higher abundance of *Ruminococcus* (involved in the fermentation of dietary fibers) in ASD children than in TD ones (25), but we have not found a significant difference in those groups.

In short, advances in the study of intestinal microbiota have led to new research, but the results have been disparate due to the complexity of the subject. A number of investigations show that gut microbiota may modulate brain function via metabolic and signaling pathways in charge of social cognition and emotional regulation (56). Our results show how gut microbiota composition is related to food consumption, nutritional status, and neurodevelopment. Based on these results and the possibility of further investigating the interaction between diet, gut microbiota, and autism through intervention studies, it would be possible to establish a clear relationship between specific bacteria profiles, food intake, and neurodevelopment. This could help establish preventive and treatment strategies for autism. Further studies focusing on an associated analysis of these topics in a large sample of children are needed to improve recommendations for this population.

## Study limitations

Research limitation is related to the small size of the sample, and the fact that the amount of dietary intake was estimated by the food frequency questionnaire instead of being accurately measured. However, these questionnaires are the most economical and validated method used worldwide, and we consider this study as an important input to the knowledge on this topic and for other types of research, since there are few studies that address the relationship of the intestinal microbiota with dietary intake and nutritional status in children with ASD.

## Conclusion

In this study, we observed differences in the composition of gut bacteria in children with autism spectrum disorder and typical development in only two species (*Bifidobacterium longum* and *Clostridium glycolicum*), but when we analyzed these two populations taking into account dietary intake and nutritional status, we were able to observe more differences. We found positive and negative associations between the intake of dairy, vegetable drinks, cereals with gluten and without gluten, food source of proteins, fish, food source of fat, and coconut oil, with the gut microbiota, independent of potential confounder variables such as age, being on a gluten- and casein-free diet, and neurodevelopment. Moreover, analyzing and comparing the higher and lower intake of these food groups allowed us to observe in greater depth how intake quantities are associated with higher or lower abundances of gut bacteria. Pending further studies, these results might be considered as a starting point for the nutritional treatment of ASD children.

## Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the NCBI with links to BioProject accession number PRJNA988151 in the NCBI BioProject database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA988151>).

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Research Ethics Committee of the Universidad de la República's School of Nutrition (CEIN). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

## Author contributions

PM: designed and conducted research, analyzed data, performed statistical analysis, wrote the manuscript, and had primary responsibility for final content. MG: designed research, analyzed data, performed statistical analysis, had primary responsibility for final content, and supervision and review. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

The study was supported by R&D Investment Program (ICEX Spain).

## References

- Ding X, Xu Y, Zhang X, Zhang L, Duan G, Song C, et al. Gut microbiota changes in patients with autism spectrum disorders. *J Psychiatr Res.* (2020) 129:149–59. doi: 10.1016/j.jpsychires.2020.06.032
- Kong X, Liu J, Cetinbas M, Sadreyev R, Koh M, Huang H, et al. New and preliminary evidence on altered oral and gut microbiota in individuals with autism spectrum disorder (ASD): implications for ASD diagnosis and subtyping based on microbial biomarkers. *Nutrients.* (2019) 11:2128. doi: 10.3390/nu11092128
- Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* (2019) 76:473–93. doi: 10.1007/s00018-018-2943-4
- Rosés C, Cuevas-Sierra A, Quintana S, Riezu-Boj JJ, Martínez JA, Milagro FI, et al. Gut microbiota bacterial species associated with mediterranean diet-related food groups in a Northern Spanish population. *Nutrients.* (2021) 13:636. doi: 10.3390/nu13020636
- McDonnell L, Gilkes A, Ashworth M, Rowland V, Harries TH, Armstrong D, et al. Association between antibiotics and gut microbiome dysbiosis in children: systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes.* (2021) 13:1–18. doi: 10.1080/19490976.2020.1870402
- Nogay NH, Nahikian-Nelms M. Can we reduce autism-related gastrointestinal and behavior problems by gut microbiota based dietary modulation? a review. *Nutr Neurosci.* (2021) 24:327–38. doi: 10.1080/1028415X.2019.1630894
- Cryan JF, O'Riordan KJ, Sandhu K, Peterson V, Dinan TG. The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol.* (2020) 19:179–94. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30356-4
- Mendive Dubourdieu P, Guerendiain M. Dietary intake, nutritional status and sensory profile in children with autism spectrum disorder and typical development. *Nutrients.* (2022) 14:2155. doi: 10.3390/nu14102155
- Quan L, Xu X, Cui Y, Han H, Hendren RL, Zhao L, et al. A systematic review and meta-analysis of the benefits of a gluten-free diet and/or casein-free diet for children with autism spectrum disorder. *Nutr Rev.* (2022) 80:1237–46. doi: 10.1093/nutrit/nuab073
- Keller A, Rimstad ML, Friis Rohde J, Holm Petersen B, Bruun Korfitsen C, Tarp S, et al. The effect of a combined gluten- and casein-free diet on children and adolescents with autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* (2021) 13:470. doi: 10.3390/nu13020470
- Peretti S, Mariano M, Mazzocchi C, Mazza M, Pino MC, Verrotti Di Pianella A, et al. Diet: the keystone of autism spectrum disorder? *Nutr Neurosci.* (2019) 22:825–39. doi: 10.1080/1028415X.2018.1464819
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms.* (2019) 7:14. doi: 10.3390/microorganisms7010014
- Merra G, Noce A, Marrone G, Cintoni M, Tarsitano MG, Capacci A, et al. Influence of mediterranean diet on human gut microbiota. *Nutrients.* (2020) 13:7. doi: 10.3390/nu13010007
- Horn J, Mayer DE, Chen S, Mayer EA. Role of diet and its effects on the gut microbiome in the pathophysiology of mental disorders. *Transl Psychiatry.* (2022) 12:164. doi: 10.1038/s41398-022-01922-0
- De Filippo C, Di Paola M, Ramazzotti M, Albanese D, Pieraccini G, Banci E, et al. Diet, environments, and gut microbiota. a preliminary investigation in children living in rural and urban Burkina Faso and Italy. *Front Microbiol.* (2017) 8:1979. doi: 10.3389/fmicb.2017.01979
- Rampelli S, Guenther K, Turrone S, Wolters M, Veidebaum T, Kourides Y, et al. Pre-obese children's dysbiotic gut microbiome and unhealthy diets may predict the development of obesity. *Commun Biol.* (2018) 1:222. doi: 10.1038/s42003-018-0221-5
- Yang YJ, Ni YH. Gut microbiota and pediatric obesity/non-alcoholic fatty liver disease. *J Formos Med Assoc.* (2019) 118(Suppl 1):S55–61. doi: 10.1016/j.jfma.2018.11.006
- Bervoets L, Van Hoorenbeeck K, Kortleven I, Van Noten C, Hens N, Vael C, et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathog.* (2013) 5:10. doi: 10.1186/1757-4749-5-10
- Lenfestey MW, Neu J. Probiotics in newborns and children. *Pediatr Clin North Am.* (2017) 64:1271–89. doi: 10.1016/j.pcl.2017.08.006
- De Filippo C, Di Paola M, Giani T, Tirelli F, Cimaz R. Gut microbiota in children and altered profiles in juvenile idiopathic arthritis. *J Autoimmun.* (2019) 98:1–12. doi: 10.1016/j.jaut.2019.01.001
- Wiggins LD, Rice CE, Barger B, Soke GN, Lee L-C, Moody E, et al. DSM-5 criteria for autism spectrum disorder maximizes diagnostic sensitivity and specificity in preschool children. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* (2019) 54:693–701. doi: 10.1007/s00127-019-01674-1
- WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO child growth standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl.* (2006) 450:76–85. doi: 10.1111/j.1651-2227.2006.tb02378.x
- Ulijaszek SJ, Kerr DA. Anthropometric measurement error and the assessment of nutritional status. *Br J Nutr.* (1999) 82:165–77. doi: 10.1017/S0007114599001348

## Acknowledgments

The authors would like to thank families for their cooperation, Loreley Castelli for assisting us in uploading the sequences to the data repository, as well as the *Agencia Nacional de Investigación e Innovación* (ANII), from Uruguay, for the PhD grant to PM.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

24. Rendo-Urteaga T, Saravia L, Sadalla Collese T, Monsalve-Alvarez JM, González-Zapata LI, Tello F, et al. Reliability and validity of an FFQ for South American children and adolescents from the SAYCARE study. *Public Health Nutr.* (2020) 23:13–21. doi: 10.1017/S1368980019002064
25. Iglesias-Vázquez L, Van Ginkel Riba G, Arijia V, Canals J. Composition of Gut Microbiota in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* (2020) 12:792. doi: 10.3390/nu12030792
26. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Anglely MT, Conlon MA. Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol.* (2011) 77:6718–21. doi: 10.1128/AEM.05212-11
27. Srikantha P, Mohajeri MH. The possible role of the microbiota-gut-brain-axis in autism spectrum disorder. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:2115. doi: 10.3390/ijms20092115
28. Weston B, Fogal B, Cook D, Dhurjati P. An agent-based modeling framework for evaluating hypotheses on risks for developing autism: effects of the gut microbial environment. *Med Hypotheses.* (2015) 84:395–401. doi: 10.1016/j.mehy.2015.01.027
29. Goma E. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek.* (2020) 113:2019–40. doi: 10.1007/s10482-020-01474-7
30. Bolte ER. Autism and clostridium tetani. *Med Hypotheses.* (1998) 51:133–44. doi: 10.1016/S0306-9877(98)90107-4
31. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome.* (2017) 5:24. doi: 10.1186/s40168-017-0242-1
32. Ahmed SA, Elhefnawy AM, Azouz HG, Roshdy YS, Ashry MH, Ibrahim AE, et al. Study of the gut microbiome profile in children with autism spectrum disorder: a single tertiary hospital experience. *J Mol Neurosci.* (2020) 70:887–96. doi: 10.1007/s12031-020-01500-3
33. Rodiño-Janeiro BK, Vicario M, Alonso-Cotoner C, Pascua-García R, Santos J. A review of microbiota and irritable bowel syndrome: future in therapies. *Adv Ther.* (2018) 35:289–310. doi: 10.1007/s12325-018-0673-5
34. Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, et al. Probiotic *bifidobacterium longum* ncc3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* (2017) 153:448–59.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2017.05.003
35. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr.* (2009) 102:1154–60. doi: 10.1017/S0007114509371767
36. Al-Ayadhi L, Zayed N, Bhat RS, Moubayed NMS, Al-Muammar MN, El-Ansary A. The use of biomarkers associated with leaky gut as a diagnostic tool for early intervention in autism spectrum disorder: a systematic review. *Gut Pathogens.* (2021) 13:54. doi: 10.1186/s13099-021-00448-y
37. Tomova A, Soltys K, Kemenyova P, Karhanek M, Babinska K. The influence of food intake specificity in children with autism on gut microbiota. *Int J Mol Sci.* (2020) 21:2797. doi: 10.3390/ijms21082797
38. Sgritta M, Dooling SW, Buffington SA, Momin EN, Francis MB, Britton RA, et al. Mechanisms underlying microbial-mediated changes in social behavior in mouse models of autism spectrum disorder. *Neuron.* (2019) 101:246–59.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.018
39. Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, Fagioli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol.* (2016) 22:361–8. doi: 10.3748/wjg.v22.i1.361
40. Briggs AD, Kehlacher A, Tiffin R, Garnett T, Rayner M, Scarborough P. Assessing the impact on chronic disease of incorporating the societal cost of greenhouse gases into the price of food: an econometric and comparative risk assessment modelling study. *BMJ Open.* (2013) 3:e003543. doi: 10.1136/bmjopen-2013-003543
41. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The genus *Altipates*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Front Immunol.* (2020) 11:906. doi: 10.3389/fimmu.2020.00906
42. Sakkas H, Bozidis P, Touzios C, Kolios D, Athanasios G, Athanasiopoulou E, et al. Nutritional status and the influence of the vegan diet on the gut microbiota and human health. *Medicina.* (2020) 56:88. doi: 10.3390/medicina56020088
43. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* (2014) 63:1275–83. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304833
44. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol.* (2015) 15:100. doi: 10.1186/s12876-015-0330-2
45. Mukherjee A, Lordan C, Ross RP, Cotter PD. Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut Microbes.* (2020) 12:1802866. doi: 10.1080/19490976.2020.1802866
46. Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett.* (2014) 588:4223–33. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.039
47. Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, et al. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut.* (2016) 65:415–25. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307649
48. Haro C, Villatoro M, Vaquero L, Pastor J, Giménez MJ, Ozuna CV, et al. The dietary intervention of transgenic low-gluten wheat bread in patients with non-celiac gluten sensitivity (NCGS) showed no differences with gluten free diet (GFD) but provides better gut microbiota profile. *Nutrients.* (2018) 10:1964. doi: 10.3390/nu10121964
49. Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun.* (2015) 48:186–94. doi: 10.1016/j.bbi.2015.03.016
50. Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on gut microbiota associated to mediterranean diet adherence and specific dietary intakes on general adult population. *Front Microbiol.* (2018) 9:890. doi: 10.3389/fmicb.2018.00890
51. Mikami A, Ogita T, Namai F, Shigemori S, Sato T, Shimosato T. Oral administration of flavonifractor plautii, a bacteria increased with green tea consumption, promotes recovery from acute colitis in mice via suppression of IL-17. *Front Nutr.* (2020) 7:610946. doi: 10.3389/fnut.2020.610946
52. Tsafrakidou P, Michaelidou AM, C GB. Fermented cereal-based products: nutritional aspects, possible impact on gut microbiota and health implications. *Foods.* (2020) 9:734. doi: 10.3390/foods9060734
53. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. *Cell Metab.* (2015) 22:658–68. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.026
54. Urwin HJ, Miles EA, Noakes PS, Kremmyda LS, Vlachava M, Diaper ND, et al. Effect of salmon consumption during pregnancy on maternal and infant faecal microbiota, secretory IgA and calprotectin. *Br J Nutr.* (2014) 111:773–84. doi: 10.1017/S0007114513003097
55. Patrone V, Minuti A, Lizier M, Miragoli F, Lucchini F, Trevisi E, et al. Differential effects of coconut versus soy oil on gut microbiota composition and predicted metabolic function in adult mice. *BMC Genomics.* (2018) 19:808. doi: 10.1186/s12864-018-5202-z
56. Chernikova MA, Flores GD, Kilroy E, Labus JS, Mayer EA, Aziz-Zadeh L. The brain-gut-microbiome system: pathways and implications for autism spectrum disorder. *Nutrients.* (2021) 13:4497. doi: 10.3390/nu13124497

## ANEXO 2

## Article

# Dietary Intake, Nutritional Status and Sensory Profile in Children with Autism Spectrum Disorder and Typical Development

Paula Mendive Dubourdieu <sup>1,\*</sup> and Marcela Guerendiain <sup>2</sup> 
<sup>1</sup> Departamento de Educación, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo CP 11600, Uruguay

<sup>2</sup> Área de Investigación, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo CP 11600, Uruguay; mguerendiain@nutricion.edu.uy

\* Correspondence: mpmendive@nutricion.edu.uy; Tel.: +598292005846

**Abstract:** Children with autism spectrum disorder (ASD) may consume a restricted diet, whether due to sensory sensitivities or an adherence to a gluten and casein free (GCF) diet. Our objective was to analyze dietary intake, nutritional status, and sensory profile in children with and without ASD. A descriptive, cross-sectional study was carried out in 65 children (3–12 years, ASD = 35, typical development (TD) = 30). Short Sensory Profile and food frequency questionnaires were applied. All participants were categorized into normal weight and excess weight, typical sensory performance (TP), and probable + definite difference (PD + DD); and ASD group into GCF dieters (ASD-diet) and non-dieters (ASD-no diet). Children with ASD had a higher intake (gr or ml/d) of vegetable drinks ( $p = 0.001$ ), gluten-free cereals ( $p = 0.003$ ), and a lower intake of fish ( $p < 0.001$ ) than TD ones. The ASD group showed a lower score in total sensory profile score ( $p < 0.001$ ) than TD group. In the ASD group, those who had PD + DD in their sensory profile consumed fewer dairies ( $p = 0.019$ ), and more cereals ( $p = 0.036$ ) and protein foods ( $p = 0.034$ ) than those with TP. These findings confirm the need to consider the neurodevelopment, sensory profile, and type of diet to improve the ASD child's nutrition. Further long-term research is needed to explore their impact on health.

**Keywords:** autism; food intake; nutritional status; sensory profile; gluten-casein free diet; food selectivity



**Citation:** Mendive Dubourdieu, P.; Guerendiain, M. Dietary Intake, Nutritional Status and Sensory Profile in Children with Autism Spectrum Disorder and Typical Development. *Nutrients* **2022**, *14*, 2155. <https://doi.org/10.3390/nu14102155>

Academic Editor: Asim K. Duttaroy

Received: 17 April 2022

Accepted: 20 May 2022

Published: 22 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Worldwide prevalence of people diagnosed with autism spectrum disorder (ASD) is increasing and, in 2019, the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimated that 1 in 59 children had ASD [1,2]. Multiple environmental, immunologic, and genetic factors play a role in its pathogenesis [3]. Hence, interest in the effect of special diets and nutrition on autism is increasing, particularly as a way to improve behavior, attention span, social interaction, and eye contact [4]. Many studies have shown that some children and adolescents with autism are on a gluten and casein free (GFCF) diet [5,6]. Graf-Myles et al. reported that diet restrictions can impact dietary intake of cereals and dairy and may also lead to a lower intake of calcium and grains supplemented with folate in ASD group as compared to TD group [7].

Furthermore, rigid and repetitive dietary patterns are frequently observed in this population [1]. Some sensory processing problems, such as sensory modulation expressed as hyper and/or hyposensitivity, seem to make it more challenging for a child to adapt to new foods and have an impact on their development [2]. On the other hand, neurotypical children around the age of six often show a preference for certain foods and a rejection of others as a part of their developmental age [3,4]. Many influencing factors can affect an individual's food choices, and studies suggest that eating disorders in autism may be one significant contributor to comorbidities such as gastrointestinal symptoms [2,5,6].

Additionally, some studies show that children with ASD have greater rates of overweight or obesity than typically developing (TD) ones, and this fact could be related to unusual dietary patterns and decreased opportunities for physical activity [7]. Furthermore, a normal body mass index (BMI) might hide nutritional inadequacies. A rejection of the intake of certain food groups, such as those rich in protein, and an increased consumption of caloric high-fat foods have been observed in children with ASD [8].

Although children and adolescents with autism are known to be highly selective when choosing food and tend to pick specific food textures, colors, smells, or other characteristics, only a few studies currently exist examining their food choices or comparing them to TD children [4]. Much available and public research focuses on nutrients or supplement intake but does not provide information on their diet or nutritional status. Therefore, our objective was to describe and analyze children's nutritional status with anthropometric measures, dietary intake, and sensory profile using the Short Sensory Profile (SSP) parent-reported questionnaire in children and adolescents with ASD and TD [9].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Participants and Study Design

A descriptive, cross-sectional study was carried out in 65 children aged 3 to 12 years with ASD (n = 35) and TD (n = 30), recruited in Montevideo, Uruguay; participants in research project *Alimentación, nutrición y salud intestinal en niños y adolescentes con Trastorno del Espectro Autista y neurotípicos* (food, nutrition, and intestinal health in children and adolescents with autism spectrum disorder and neurotypicals). Participants were recruited through advertising the study in parents of children with autism organizations and at autism therapy centers. Inclusion criteria for the ADS group was a clinical diagnosis by a psychiatrist or a pediatric neurology specialist, confirmed by *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition* (DSM-V) criteria [10]. The TD group included children with no neurodevelopmental alterations. Those diagnosed with attention deficit and hyperactivity disorder, diabetes mellitus, genetic diseases, inborn errors of metabolism, inflammatory bowel disease, celiac disease, motor disability, or without informed parental consent were excluded from both groups. No children in the TD group were on a restricted diet.

The study meets all ethical requirements for human studies stated in the Helsinki Declaration 2000 and established in Uruguayan regulations. It was approved by the Research Ethic Committee of the School of Nutrition, Universidad de la República, and registered with the Ministry of Health of Uruguay (no. 282599).

### 2.2. Anthropometric Measures

Anthropometric variables were assessed during an interview with the children and their parents, and an informed consent form was previously signed. For anthropometric measurements of weight and height, participants wore light clothing and were barefoot according to techniques standardized by Frisancho and the World Health Organization (WHO) [11,12]. Measurements were performed by the same nutritionist researcher in triplicate in order to avoid interobserver errors and were later averaged. Weight was measured using a portable electronic scale (Seca 813, Hamburg, Germany), with a maximum capacity of 200 kg and an accuracy of 100 g. Height was measured using a portable height rod (208 Seca) with a range of 810 to 2060 mm and a precision of 1 mm. Readings were recorded in meters and centimeters. Birth weight data were taken from the pediatric card of each participant.

Nutritional status was assessed according to the height-for-age (H/A) and body mass index-for-age (BMI/A) indicators, expressed in z-score (z). Software Anthro (for children aged 3 to 5 years) and Anthro plus (for children and adolescents aged 5 to 12 years) (WHO v.1.0.2, 2007), which apply WHO child growth curves [12], were used. Cut-off points used for the BMI/A of children aged 2–5 years are: >3SD, obesity; >2SD, overweight; >1SD, risk of overweight; between <1SD and >−1SD, normal weight; ≤−1SD, risk of wasting; ≤−2SD, emaciation; ≤−3SD, severe emaciation. In those over 5 years old: ≥2SD, obesity;

$\geq 1SD$ , overweight; between  $<1SD$  and  $>-2SD$ , normal weight;  $\leq -2SD$ , wasting,  $\leq -3SD$ ; severe emaciation. For the purpose of analysis, both age groups were unified into two categories: normal weight (NW) and excess weight (EW) (risk of overweight + overweight + obesity). The use of cut-off points for deficit malnutrition (risk of wasting, wasting and severe wasting) was ruled out since sample size was small (ASD  $n = 4$ ; TD  $n = 1$ ); therefore, these participants were not considered for our anthropometric analysis.

### 2.3. Dietary Intake

Children with ASD were classified into two groups, one consisting of those on a gluten-free and casein-free diet (ASD-diet,  $n = 19$ ), and a second one formed by those without a restricted diet (ASD-no diet,  $n = 16$ ).

During the same interview where anthropometric data were taken, information on the dietary intake over the past 3 months was collected by the nutritionist researcher. The SAYCARE study food frequency questionnaire (FFQ) [13], validated for children and adolescents from seven cities in Latin America, was applied. It includes a photographic atlas with the weight of each food. This questionnaire was adapted to our subject population in order to obtain further information on the consumption of gluten-free and casein-free foods, due to its relevance to our study. A food photo booklet was shown to caregivers and children with the FFQ for them to identify food portion size. The amount of food consumed was described using home measures and then converted into grams or ml, depending on the type of food. The daily intake of each food was estimated taking consumption frequency into account.

Foods were organized into different groups as follows: (1) dairy products, 'total dairy': milk, yogurt, chocolate milk, dairy desserts, cheese; (2) 'vegetable drinks': birdseed, chestnut, almond, oat, rice, and coconut drinks; (3) cereals, 'cereals with gluten': pasta, bread, cookies, bakery products, breakfast cereals, pizza, and empanadas (dough stuffed with meat, fish, vegetables, etc. baked or fried), 'cereals without gluten': the same foods in the previous group without gluten, and rice; (4) meats and derivatives, and eggs, 'total protein foods': meat, minced meat, chicken, pork, eggs, fresh and canned fish and *milanesa* steak with and without gluten (a thin slice of beef dipped in beaten eggs and breaded; the fact that 25% of its weight is due to cereal has been taken into account); (5) 'total high-fat foods': butter, ghee (fat obtained by heating cow milk butter), and oils.

### 2.4. Sensory Sensitivity

Parents completed a validated online questionnaire to determine their children's sensory features. The Spanish version of the Short Sensory Profile (McIntosh et al. 1999) questionnaire was applied to establish the frequency of a child's sensory, behavioral, or emotional responses to daily life events. The questionnaire contains seven subscales: tactile sensitivity, taste/smell sensitivity, movement sensitivity, under responsive/seek sensation, auditory filtering, low energy/weak, and visual/auditory sensitivity. Each item represents observable child behaviors and is rated on a five-point scale ranging from 'always' to 'never' (1: always, 2: frequently, 3: occasionally, 4: rarely, 5: never), resulting in a potential maximum score of 190. The total score obtained can be classified into three categories: typical performance (TP: 190–155), probable difference (PD: 154–142), definite difference (DD: 141–38). In our case, due to a small sample size, we grouped PD and DD together, and therefore two categories were used (TP and PD + DD).

### Statistical Analysis

IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) was used for statistical analyses. Results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD), for quantitative variables. The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess variable distribution. Independent sample *t*-test (for parameters with normal distribution) and Mann–Whitney test (variables without normal distribution) was carried out to analyze anthropometric characteristics, dietary intake, and sensory profile score, according to neurodevelopment (ASD or TD)

and autistic children's diet (ASD-d or ASD-nd). A  $p$ -value  $< 0.05$  was set for statistical significance (two-tailed).

To study dietary intake according to nutritional status (NW and EW) or sensory profile score (TP and PD + DD) in ASD and TD, foods without a normal distribution were log transformed (milk + yogurt, cheese, total dairy, cereals with and without gluten, meat, minced meat, chicken, pork, *milanesa* with and without gluten, eggs, fish, total protein food, butter, ghee, oils, and total food source of fat). Variable analysis was performed applying two-way ANCOVA (adjusted for birth weight, total sensory profile score and with GFCF diet/not restricted diet; or birth weight, nutritional status and with GFCF diet/not restricted diet; respectively), exploring possible main effects of factors and interactions among them. Pair comparisons between the different groups were adjusted by Bonferroni post hoc test. Comparisons between NW and EW or between TP and PD + DD in all participants ('All') were carried out using one-way ANCOVA and correcting for potential confounders (birth weight, total sensory profile score, and with GFCF diet/not restricted diet; or birth weight, nutritional status, and with GFCF diet/not restricted diet, respectively).

### 3. Results

Children's anthropometric characteristics and dietary intake are presented in Table 1. Mean height, weight, BMI, BMI-for-age Z-score, height-for-age z-score, and birth weight showed no significant differences between ASD-diet and ASD-no diet groups, and between all children with autism (ASD-t) and the TD group. However, there is a significant difference in mean age between ASD-t group and TD group ( $p = 0.045$ ).

**Table 1.** Anthropometric characteristics and dietary intake in children with autism spectrum disorder and typical development.

| Parameters                                   | ASD Groups           |                      |                              | ASD-Total Group      | TD Group             | $p^{**}$                     |
|----------------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|
|                                              | ASD-Diet             | ASD-No Diet          | $p^*$                        |                      |                      |                              |
| <i>Anthropometric characteristics</i>        | ( $n = 19$ )         | ( $n = 16$ )         |                              | ( $n = 35$ )         | ( $n = 30$ )         |                              |
| Age (years)                                  | 6.05 $\pm$ 2.27      | 5.57 $\pm$ 1.91      | 0.688 <sup>1</sup>           | 5.83 $\pm$ 2.10      | 7.19 $\pm$ 2.56      | <b>0.045<sup>1</sup></b>     |
| Height (cm)                                  | 118.11 $\pm$ 13.74   | 117.83 $\pm$ 12.83   | 0.882 <sup>2</sup>           | 117.98 $\pm$ 13.14   | 125.43 $\pm$ 18.31   | 0.069 <sup>2</sup>           |
| Weight (Kg)                                  | 23.47 $\pm$ 6.25     | 24.73 $\pm$ 6.00     | 0.766 <sup>1</sup>           | 24.05 $\pm$ 6.08     | 29.37 $\pm$ 11.78    | 0.266 <sup>1</sup>           |
| BMI (Kg/m <sup>2</sup> )                     | 16.60 $\pm$ 2.26     | 17.71 $\pm$ 2.27     | 0.233 <sup>1</sup>           | 17.11 $\pm$ 2.30     | 17.89 $\pm$ 2.70     | 0.469 <sup>1</sup>           |
| BMI for Age Z-score                          | 0.50 $\pm$ 1.48      | 1.37 $\pm$ 1.32      | 0.078 <sup>1</sup>           | 0.89 $\pm$ 1.45      | 0.92 $\pm$ 1.04      | 0.921 <sup>1</sup>           |
| Height for Age Z-score                       | −0.003 $\pm$ 1.17    | 0.58 $\pm$ 1.12      | 0.140 <sup>2</sup>           | 0.26 $\pm$ 1.17      | 0.31 $\pm$ 1.19      | 0.833 <sup>2</sup>           |
| Birth Weight (Kg)                            | 3179.37 $\pm$ 690.53 | 3519.69 $\pm$ 694.47 | 0.157 <sup>2</sup>           | 3334.94 $\pm$ 703.42 | 3268.63 $\pm$ 462.58 | 0.651 <sup>2</sup>           |
| <i>Dietary intake</i>                        | ( $n = 18$ )         | ( $n = 15$ )         |                              | ( $n = 33$ )         | ( $n = 29$ )         |                              |
| <i>Dairy products</i>                        |                      |                      |                              |                      |                      |                              |
| Milk + Yogurt (g/day)                        | 0.00 $\pm$ 0.00      | 191.89 $\pm$ 262.56  | <b>&lt;0.001<sup>1</sup></b> | 87.22 $\pm$ 198.94   | 353.40 $\pm$ 237.32  | <b>&lt;0.001<sup>1</sup></b> |
| Cheese (g/day)                               | 0.71 $\pm$ 2.41      | 15.62 $\pm$ 14.17    | <b>&lt;0.001<sup>1</sup></b> | 7.49 $\pm$ 12.15     | 16.60 $\pm$ 15.42    | <b>0.002<sup>1</sup></b>     |
| T. Dairy (g/day)                             | 0.71 $\pm$ 2.41      | 284.98 $\pm$ 275.95  | <b>&lt;0.001<sup>1</sup></b> | 129.92 $\pm$ 232.33  | 401.95 $\pm$ 243.96  | <b>&lt;0.001<sup>1</sup></b> |
| <i>Vegetable drinks</i>                      |                      |                      |                              |                      |                      |                              |
| Vegetable drinks (ml/day)                    | 399.33 $\pm$ 415.82  | 42.26 $\pm$ 104.59   | <b>0.003<sup>1</sup></b>     | 237.03 $\pm$ 359.50  | 26.72 $\pm$ 118.38   | <b>0.001<sup>1</sup></b>     |
| <i>Cereals</i>                               |                      |                      |                              |                      |                      |                              |
| Cereals with gluten (g/day)                  | 5.78 $\pm$ 10.32     | 210.32 $\pm$ 127.05  | <b>&lt;0.001<sup>1</sup></b> | 98.75 $\pm$ 133.47   | 236.58 $\pm$ 107.65  | <b>&lt;0.001<sup>1</sup></b> |
| Cereals without gluten (g/day)               | 138.97 $\pm$ 88.08   | 42.61 $\pm$ 65.21    | <b>0.001<sup>1</sup></b>     | 95.17 $\pm$ 80.39    | 27.14 $\pm$ 57.71    | <b>0.003<sup>1</sup></b>     |
| T. Cereals (with and without gluten) (g/day) | 144.76 $\pm$ 88.37   | 252.93 $\pm$ 119.18  | <b>0.005<sup>2</sup></b>     | 193.93 $\pm$ 115.56  | 266.68 $\pm$ 104.90  | <b>0.009<sup>2</sup></b>     |
| <i>Meats and derivatives, and eggs</i>       |                      |                      |                              |                      |                      |                              |
| Meat (g/day)                                 | 43.15 $\pm$ 26.20    | 34.05 $\pm$ 27.09    | 0.291 <sup>1</sup>           | 39.01 $\pm$ 26.59    | 31.65 $\pm$ 18.20    | 0.335 <sup>1</sup>           |
| Minced meat (g/day)                          | 50.70 $\pm$ 114.79   | 21.06 $\pm$ 23.91    | 0.340 <sup>1</sup>           | 37.23 $\pm$ 86.46    | 19.49 $\pm$ 14.57    | 0.718 <sup>1</sup>           |
| Chicken (g/day)                              | 34.38 $\pm$ 27.98    | 48.60 $\pm$ 58.34    | 0.360 <sup>1</sup>           | 40.84 $\pm$ 44.24    | 29.51 $\pm$ 19.35    | 0.466 <sup>1</sup>           |

Table 1. Cont.

| Parameters                          | ASD Groups      |                |                               | ASD-Total Group | TD Group       | p **                          |
|-------------------------------------|-----------------|----------------|-------------------------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
|                                     | ASD-Diet        | ASD-No Diet    | p *                           |                 |                |                               |
| Pork (g/day)                        | 14.92 ± 22.21   | 3.21 ± 4.61    | 0.128 <sup>1</sup>            | 9.60 ± 17.50    | 2.57 ± 3.59    | 0.307 <sup>1</sup>            |
| Milanesa with gluten (g/day)        | 3.07 ± 7.17     | 28.04 ± 45.10  | <b>&lt;0.001</b> <sup>1</sup> | 14.42 ± 32.81   | 16.10 ± 12.74  | <b>0.014</b> <sup>1</sup>     |
| Milanesa without gluten (g/day)     | 10.25 ± 16.25   | 0.35 ± 1.35    | <b>0.004</b> <sup>1</sup>     | 5.75 ± 12.89    | 1.24 ± 4.33    | <b>0.032</b> <sup>1</sup>     |
| Eggs (g/day)                        | 43.70 ± 68.38   | 29.00 ± 34.70  | 0.456 <sup>1</sup>            | 37.01 ± 55.37   | 27.37 ± 18.79  | 0.588 <sup>1</sup>            |
| <i>Fish</i>                         |                 |                |                               |                 |                |                               |
| Fresh fish (g/day)                  | 0.04 ± 0.18     | 0.00 ± 0.00    | 0.361 <sup>1</sup>            | 0.02 ± 0.13     | 8.22 ± 7.99    | <b>&lt;0.001</b> <sup>1</sup> |
| Canned fish (g/day)                 | 0.00 ± 0.00     | 0.00 ± 0.00    | 0.533 <sup>1</sup>            | 0.00 ± 0.00     | 5.73 ± 9.89    | <b>&lt;0.001</b> <sup>1</sup> |
| Fish (fresh and canned) (g/day)     | 0.04 ± 0.18     | 0.00 ± 0.00    | 0.361 <sup>1</sup>            | 0.02 ± 0.13     | 13.97 ± 12.54  | <b>&lt;0.001</b> <sup>1</sup> |
| T. foods source of proteins (g/day) | 206.05 ± 129.84 | 183.21 ± 98.64 | 0.656 <sup>1</sup>            | 195.67 ± 115.53 | 160.84 ± 50.69 | 0.386 <sup>1</sup>            |
| <i>Butter, ghee, and oils</i>       |                 |                |                               |                 |                |                               |
| Butter (g/day)                      | 0.07 ± 0.33     | 2.17 ± 6.35    | <b>0.016</b> <sup>1</sup>     | 1.03 ± 4.34     | 2.93 ± 5.36    | <b>0.004</b> <sup>1</sup>     |
| Ghee (g/day)                        | 1.90 ± 5.85     | 0.00 ± 0.00    | <b>0.008</b> <sup>1</sup>     | 1.03 ± 4.37     | 0.06 ± 0.26    | 0.201 <sup>1</sup>            |
| Coconut oil (g/day)                 | 9.69 ± 11.51    | 0.48 ± 1.28    | <b>&lt;0.001</b> <sup>1</sup> | 5.50 ± 9.63     | 0.95 ± 3.49    | <b>0.006</b> <sup>1</sup>     |
| Oil (g/day)                         | 27.16 ± 18.69   | 18.60 ± 11.73  | 0.122 <sup>1</sup>            | 23.27 ± 16.26   | 20.23 ± 13.24  | 0.494 <sup>1</sup>            |
| T. foods source of fat (g/day)      | 40.22 ± 22.93   | 21.25 ± 13.85  | <b>0.007</b> <sup>1</sup>     | 31.60 ± 21.33   | 24.18 ± 15.57  | 0.203 <sup>1</sup>            |

Results are expressed as mean ± SD. Statistically significant differences (indicated in bold):  $p < 0.05$  (<sup>1</sup> Mann-Whitney test, <sup>2</sup>  $t$  test). ASD: autism spectrum disorder, ASD-diet: ASD children with dietary intake without gluten and casein, ASD-no diet: ASD children without restricted diet, ASD-total: ASD children with and without restricted diet. TD: typical development, BMI: body mass index, FFQ: food frequency questionnaire, T: total. Comparison between: \* ASD-diet and ASD-no diet, \*\* ASD-total group and TD group.

As expected, children in the ASD-diet group consumed a significantly lower amount of total dairy products ( $p < 0.001$ ), cereals with gluten ( $p < 0.001$ ), total cereals ( $p = 0.005$ ), *milanesa* with gluten ( $p < 0.001$ ), and butter ( $p = 0.016$ ), than the ASD-no diet. The ASD-t group consumed a significantly lower amount of these foods than the TD group, total dairy products ( $p < 0.001$ ), cereals with gluten ( $p < 0.001$ ), total cereals ( $p = 0.009$ ), *milanesa* with gluten ( $p = 0.014$ ), and butter ( $p = 0.004$ ). By contrast, the mean intake of vegetable drinks ( $p = 0.003$ ), cereals without gluten ( $p = 0.001$ ), *milanesa* without gluten ( $p = 0.004$ ), and coconut oil ( $p < 0.001$ ) was higher in ASD-diet than in the ASD-no diet group, and there was also a significant difference between the ASD-t group and neurotypicals (vegetable drinks:  $p = 0.001$ ; cereals without gluten:  $p = 0.003$ ; *milanesa* without gluten:  $p = 0.032$ ; coconut oil:  $p = 0.006$ ). Children with ASD who were on a GFCF diet consumed significantly more ghee ( $p < 0.008$ ) and total foods source of fat ( $p = 0.007$ ) than those without a restricted diet. Furthermore, in the ASD-t group fish intake was lower than in TD ones ( $p < 0.001$ ).

Mean scores in the ASD-diet, ASD-no diet, ASD-t, and TD groups, for the different items of the SSP questionnaire, are displayed in Table 2. Scores for tactile sensitivity ( $p < 0.001$ ), taste/smell sensitivity ( $p = 0.005$ ), under responsive/seeks sensation ( $p < 0.001$ ), auditory filtering ( $p < 0.001$ ), and total sensory profile ( $p < 0.001$ ) were significantly higher in TD group than in ASD-t group, showing a greater sensitivity in children with ASD. When diet was considered, the ASD-no diet group obtained a significantly higher score in visual/auditory sensitivity ( $p < 0.001$ ) and low energy/weak ( $p = 0.010$ ) than ASD-diet group.

In Table 3, the comparison of dietary intake between nutritional status (NW vs. EW) and neurodevelopment (ASD vs. TD) groups was analyzed by two-way ANCOVA to explore potential main effects of factors and interactions among them. Only the coconut oil intake showed a significant interaction between nutritional status and ASD/TD groups ( $F(1, 16) = 7.589$ ,  $p = 0.014$ ,  $\eta^2 = 0.322$ ). The nutritional status factor also showed a significant main effect on coconut oil ( $F(1, 16) = 6.004$ ,  $p = 0.026$ ,  $\eta^2 = 0.273$ ). Having ASD or TD had a statistically significant main effect on the intake of milk + yogurt ( $F(1, 30) = 6.299$ ,  $p = 0.018$ ,  $\eta^2 = 0.174$ ). Children with a normal weight in ASD had a significantly lower mean intake of

milk + yogurt ( $p = 0.007$ ) and total dairy ( $p = 0.014$ ), and a significantly higher mean intake of minced meat ( $p = 0.010$ ) and coconut oil g/d ( $p = 0.011$ ) than those with a normal weight in the TD group. Additionally, in the TD group, children with a normal weight consumed a significantly lower amount of coconut oil ( $p = 0.003$ ) than those with excess weight. However, children in the group All (ASD + TD) with a normal weight had a higher intake of coconut oil ( $p = 0.026$ ) than the excess weight ones.

**Table 2.** Sensory profile in children with autism spectrum disorder and typical development.

| Sensory Profile Components (Score) | ASD-Diet ( $n = 19$ ) | ASD-No Diet ( $n = 16$ ) | $p^*$                         | ASD-Total ( $n = 35$ ) | TD ( $n = 30$ ) | $p^{**}$                      |
|------------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Tactile sensitivity                | 29.37 ± 3.23          | 29.19 ± 4.47             | 0.891 <sup>1</sup>            | 29.29 ± 3.79           | 33.40 ± 1.69    | <b>&lt;0.001</b> <sup>1</sup> |
| Taste/smell sensitivity            | 14.21 ± 4.82          | 12.06 ± 5.77             | 0.239 <sup>1</sup>            | 13.63 ± 2.27           | 16.83 ± 3.48    | <b>0.005</b> <sup>1</sup>     |
| Movement sensitivity               | 13.32 ± 2.79          | 14.00 ± 1.46             | 0.411 <sup>1</sup>            | 13.87 ± 1.40           | 14.00 ± 1.64    | 0.629 <sup>1</sup>            |
| Under responsive/seeks sensation   | 21.37 ± 5.18          | 21.13 ± 5.57             | 0.894 <sup>2</sup>            | 21.26 ± 5.28           | 29.27 ± 4.88    | <b>&lt;0.001</b> <sup>2</sup> |
| Auditory filtering                 | 20.79 ± 3.22          | 21.19 ± 3.92             | 0.744 <sup>1</sup>            | 20.97 ± 3.51           | 27.23 ± 1.77    | <b>&lt;0.001</b> <sup>1</sup> |
| Low energy/weak                    | 25.84 ± 4.91          | 29.06 ± 1.80             | <b>0.010</b> <sup>1</sup>     | 27.31 ± 4.10           | 27.23 ± 3.31    | 0.546 <sup>1</sup>            |
| Visual/auditory sensitivity        | 18.16 ± 4.41          | 24.13 ± 1.31             | <b>&lt;0.001</b> <sup>1</sup> | 20.89 ± 4.49           | 21.13 ± 4.16    | 0.841 <sup>1</sup>            |
| T. Short Sensory Profile           | 143.28 ± 16.35        | 150.75 ± 17.95           | 0.301 <sup>2</sup>            | 146.70 ± 17.26         | 169.10 ± 10.39  | <b>&lt;0.001</b> <sup>2</sup> |

Results are expressed as mean ± SD. Statistically significant differences (indicated in bold):  $p < 0.05$  (<sup>1</sup> Mann–Whitney test, <sup>2</sup>  $t$  test). ASD: autism spectrum disorder; ASD-diet: ASD children with dietary intake without gluten and casein; ASD-no diet: children with ASD without restricted diet; ASD-total: children with ASD with and without restricted diet; TD: typical development; T: total. Comparison between: \* ASD-diet and ASD-no diet,  $p^{**}$  ASD-total group and TD group.

In Table 4, the comparison of dietary intake between sensory profile (TP vs. P + DD) and neurodevelopment (ASD vs. TD) groups was studied by two-way ANCOVA. The sensory profile factor showed a significant main effect on cheese intake ( $F(1, 35) = 7.533$ ,  $p = 0.009$ ,  $\eta^2 = 0.177$ ). The neurodevelopment factor showed a significant main effect on coconut oil ( $F(1, 17) = 4.489$ ,  $p = 0.049$ ,  $\eta^2 = 0.209$ ). In the ASD group, children with TP consumed higher milk + yogurt ( $p = 0.009$ ), total dairy products ( $p = 0.019$ ), meat ( $p = 0.047$ ); lower total cereals (with and without gluten) ( $p = 0.036$ ); and total protein foods ( $p = 0.034$ ) than PD + DD ones. Children with ASD and a TP had a lower intake of milk + yogurt ( $p = 0.004$ ) and total dairy products ( $p = 0.037$ ), and higher consumption of coconut oil ( $p = 0.049$ ) than the TD children with TP. When all children (ASD + TD) were studied, those with TP showed a higher intake of cheese than the PD + DD group ( $p = 0.009$ ).

**Table 3.** Comparison of dietary intake between nutritional status groups (normal weight vs. excess weight) and neurodevelopment groups (autism spectrum disorder vs. typical development) by two-way ANCOVA.

| Dietary Intake                               | ASD-Total Group        |                                  | TD Group               |                                 | All                    |                                  | Pair Comparisons |       |              |       |       | Nutritional Status Factor | Main Effects Neurodevelopment Factor | Interactions Nutritional Status $\times$ Neurodevelopment |
|----------------------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------|-------|--------------|-------|-------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                                              | Normal Weight (n = 20) | Excess Weight (OW + OB) (n = 11) | Normal Weight (n = 20) | Excess Weight (OW + OB) (n = 9) | Normal Weight (n = 41) | Excess Weight (OW + OB) (n = 20) | $p^1$            | $p^2$ | $p^3$        | $p^4$ | $p^5$ |                           |                                      |                                                           |
| <i>Dairy products</i>                        |                        |                                  |                        |                                 |                        |                                  |                  |       |              |       |       |                           |                                      |                                                           |
| Milk + Yogurt (g/day)                        | 81.23 $\pm$ 189.59     | 106.59 $\pm$ 231.30              | 400.69 $\pm$ 244.35    | 248.33 $\pm$ 193.17             | 237.06 $\pm$ 269.20    | 170.37 $\pm$ 221.59              | 0.848            | 0.224 | <b>0.007</b> | 0.243 | 0.614 | NS                        | **                                   | NS                                                        |
| Cheese (g/day)                               | 5.02 $\pm$ 10.11       | 12.90 $\pm$ 14.76                | 17.64 $\pm$ 15.21      | 14.30 $\pm$ 16.54               | 11.17 $\pm$ 14.21      | 13.53 $\pm$ 15.18                | 0.901            | 0.140 | 0.079        | 0.831 | 0.400 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| T. Dairy (g/day)                             | 120.10 $\pm$ 229.46    | 160.49 $\pm$ 253.98              | 453.36 $\pm$ 248.11    | 287.70 $\pm$ 202.04             | 282.67 $\pm$ 289.84    | 217.73 $\pm$ 235.27              | 0.588            | 0.102 | <b>0.014</b> | 0.697 | 0.530 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| <i>Vegetable drinks</i>                      |                        |                                  |                        |                                 |                        |                                  |                  |       |              |       |       |                           |                                      |                                                           |
| Vegetable Drinks (ml/day)                    | 295.85 $\pm$ 403.33    | 89.45 $\pm$ 204.80               | 38.75 $\pm$ 141.99     | 0.00 $\pm$ 0.00                 | 170.43 $\pm$ 328.39    | 49.20 $\pm$ 155.43               | 0.266            | -     | 0.382        | -     | 0.506 | NS                        | NS                                   | -                                                         |
| <i>Cereals</i>                               |                        |                                  |                        |                                 |                        |                                  |                  |       |              |       |       |                           |                                      |                                                           |
| Cereals with gluten (g/day)                  | 79.66 $\pm$ 127.14     | 142.71 $\pm$ 145.27              | 246.18 $\pm$ 104.89    | 215.25 $\pm$ 116.99             | 160.89 $\pm$ 142.86    | 175.35 $\pm$ 135.06              | 0.245            | 0.544 | 0.079        | 0.980 | 0.688 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| Cereals without gluten (g/day)               | 107.07 $\pm$ 96.66     | 77.23 $\pm$ 84.41                | 18.94 $\pm$ 24.44      | 54.88 $\pm$ 96.75               | 64.08 $\pm$ 83.33      | 67.17 $\pm$ 88.44                | 0.274            | 0.271 | 0.131        | 0.525 | 0.725 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| T. Cereals (with and without gluten) (g/day) | 186.73 $\pm$ 108.84    | 219.95 $\pm$ 127.93              | 265.13 $\pm$ 105.57    | 270.13 $\pm$ 109.65             | 224.97 $\pm$ 113.09    | 242.53 $\pm$ 119.72              | 0.697            | 0.564 | 0.289        | 0.115 | 0.898 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| <i>Meat, fish, and eggs</i>                  |                        |                                  |                        |                                 |                        |                                  |                  |       |              |       |       |                           |                                      |                                                           |
| Meat (g/day)                                 | 37.07 $\pm$ 25.47      | 44.45 $\pm$ 29.81                | 33.80 $\pm$ 20.13      | 26.88 $\pm$ 12.65               | 35.47 $\pm$ 22.79      | 36.55 $\pm$ 24.81                | 0.202            | 0.676 | 0.465        | 0.455 | 0.537 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| Minced meat (g/day)                          | 21.13 $\pm$ 24.79      | 70.07 $\pm$ 144.59               | 20.54 $\pm$ 15.11      | 17.17 $\pm$ 13.85               | 20.84 $\pm$ 20.39      | 46.27 $\pm$ 108.69               | 0.250            | 0.683 | <b>0.010</b> | 0.994 | 0.185 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| Chicken (g/day)                              | 43.47 $\pm$ 52.78      | 38.27 $\pm$ 24.40                | 29.10 $\pm$ 21.50      | 30.44 $\pm$ 14.51               | 36.46 $\pm$ 40.81      | 34.75 $\pm$ 20.44                | 0.956            | 0.722 | 0.474        | 0.736 | 0.775 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| Pork (g/day)                                 | 12.23 $\pm$ 20.81      | 4.16 $\pm$ 8.08                  | 2.60 $\pm$ 3.32        | 2.51 $\pm$ 4.36                 | 7.53 $\pm$ 15.67       | 3.42 $\pm$ 6.56                  | 0.685            | 0.696 | 0.527        | 0.627 | 0.576 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| Milanesa with gluten (g/day)                 | 15.72 $\pm$ 40.73      | 12.76 $\pm$ 10.56                | 13.37 $\pm$ 9.70       | 22.16 $\pm$ 16.86               | 14.57 $\pm$ 29.59      | 16.99 $\pm$ 14.19                | 0.891            | 0.175 | 0.798        | 0.457 | 0.296 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| Milanesa without gluten (g/day)              | 6.17 $\pm$ 10.02       | 5.45 $\pm$ 18.09                 | 1.80 $\pm$ 5.16        | 0.00 $\pm$ 0.00                 | 4.04 $\pm$ 8.23        | 3.00 $\pm$ 13.41                 | 0.067            | .     | 0.557        | .     | 0.152 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| Eggs (g/day)                                 | 46.85 $\pm$ 66.02      | 21.60 $\pm$ 22.18                | 29.49 $\pm$ 19.88      | 22.66 $\pm$ 16.13               | 38.38 $\pm$ 49.44      | 22.08 $\pm$ 19.20                | 0.395            | 0.504 | 0.530        | 0.462 | 0.285 | NS                        | NS                                   | NS                                                        |
| <i>Fish</i>                                  |                        |                                  |                        |                                 |                        |                                  |                  |       |              |       |       |                           |                                      |                                                           |
| Fresh fish (g/day)                           | 0.04 $\pm$ 0.17        | 0.00 $\pm$ 0.00                  | 7.00 $\pm$ 5.13        | 10.95 $\pm$ 12.19               | 3.43 $\pm$ 4.99        | 4.93 $\pm$ 9.69                  | -                | 0.942 | -            | -     | -     | NS                        | -                                    | -                                                         |
| Canned fish (g/day)                          | 0.00 $\pm$ 0.00        | 0.00 $\pm$ 0.00                  | 7.76 $\pm$ 11.15       | 1.24 $\pm$ 3.73                 | 3.78 $\pm$ 8.63        | 0.56 $\pm$ 2.50                  | -                | 0.809 | -            | -     | 0.809 | NS                        | -                                    | -                                                         |

Table 3. *Cont.*

| Dietary Intake                                                                 | ASD-Total Group                      |                                                | TD Group                             |                                               | All                                  |                                                   | Pair Comparisons      |                       |                       |                       |                       | Main Effects                    |                            | Interactions<br>Nutritional<br>Status ×<br>Neurodevelop-<br>ment |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------|
|                                                                                | Normal<br>Weight<br>( <i>n</i> = 20) | Excess Weight<br>(OW + OB)<br>( <i>n</i> = 11) | Normal<br>Weight<br>( <i>n</i> = 20) | Excess Weight<br>(OW + OB)<br>( <i>n</i> = 9) | Normal<br>Weight<br>( <i>n</i> = 41) | Excess<br>Weight (OW<br>+ OB)<br>( <i>n</i> = 20) | <i>p</i> <sup>1</sup> | <i>p</i> <sup>2</sup> | <i>p</i> <sup>3</sup> | <i>p</i> <sup>4</sup> | <i>p</i> <sup>5</sup> | Nutritional<br>Status<br>Factor | Neurodevelopment<br>Factor |                                                                  |
| Fish (fresh and<br>canned)<br>(g/day)                                          | 0.04 ± 0.17                          | 0.00 ± 0.00                                    | 14.76 ± 11.27                        | 12.20 ± 15.62                                 | 7.22 ± 10.76                         | 5.49 ± 11.89                                      | -                     | 0.129                 | .                     | .                     | .                     | NS                              | .                          | .                                                                |
| T. foods source<br>of proteins<br>(g/day)<br><i>Butter, ghee,<br/>and oils</i> | 193.77 ± 95.40                       | 210.89 ±<br>150.39                             | 163.09 ± 51.59                       | 155.85 ± 51.31                                | 178.80 ±<br>77.82                    | 186.12 ±<br>117.48                                | 0.815                 | 0.667                 | 0.339                 | 0.542                 | 0.641                 | NS                              | NS                         | NS                                                               |
| Butter (g/day)                                                                 | 0.29 ± 0.63                          | 2.52 ± 7.47                                    | 3.55 ± 6.06                          | 1.55 ± 3.21                                   | 1.88 ± 4.51                          | 2.09 ± 5.83                                       | 0.590                 | 0.104                 | 0.306                 | 0.517                 | 0.847                 | NS                              | NS                         | NS                                                               |
| Ghee (g/day)                                                                   | 1.62 ± 5.44                          | 0.00 ± 0.00                                    | 0.08 ± 0.31                          | 0.00 ± 0.00                                   | 0.87 ± 3.93                          | 0.00 ± 0.00                                       | .                     | .                     | .                     | .                     | .                     | NS                              | NS                         | NS                                                               |
| Coconut oil<br>(g/day)                                                         | 7.79 ± 11.22                         | 1.64 ± 3.87                                    | 0.03 ± 0.06                          | 3.00 ± 6.00                                   | 4.00 ± 8.85                          | 2.25 ± 4.85                                       | 0.718                 | <b>0.003</b>          | <b>0.011</b>          | 0.552                 | <b>0.026</b>          | *                               | NS                         | ***                                                              |
| Oil (g/day)                                                                    | 23.23 ± 17.64                        | 23.18 ± 14.96                                  | 20.65 ± 14.96                        | 19.32 ± 9.00                                  | 21.97 ±<br>16.23                     | 21.44 ±<br>12.48                                  | 0.648                 | 0.927                 | 0.633                 | 0.961                 | 0.796                 | NS                              | NS                         | NS                                                               |
| T. foods source<br>of fat (g/day)                                              | 34.13 ± 23.76                        | 27.35 ± 17.03                                  | 24.32 ± 16.94                        | 23.87 ± 12.92                                 | 29.35 ±<br>21.05                     | 25.79 ±<br>15.04                                  | 0.924                 | 0.979                 | 0.627                 | 0.773                 | 0.961                 | NS                              | NS                         | NS                                                               |

Results expressed as means  $\pm$  SD. Statistically significant differences (indicated in bold,  $p < 0.05$ ; adjusted for birth weight, sensory profile, with/without diet): (a) Two-way ANCOVA, comparisons between: <sup>1</sup> normal and excess weight in ASD group, <sup>2</sup> normal and excess weight in TD group, <sup>3</sup> normal weight in ASD and TD, <sup>4</sup> excess weight in ASD and TD; \* significant main effect of nutritional status group factor, \*\* significant main effect of neurodevelopment factor, \*\*\* significant interactions between nutritional status groups and measure moment (significant main effects and interactions are described in result section), NS: no significant; (b) One-way ANCOVA, comparison between <sup>5</sup> normal weight and excess weight in all participants. ASD: autism spectrum disorder; ASD-total group: children with ASD with and without restricted diet, TD: typical development, T: total, OW: overweight, OB: obesity, All: ASD + TD children.

**Table 4.** Comparison of dietary intake between sensorial profile groups (typical performance and probable + definite difference) and neurodevelopment groups (autism spectrum disorder vs. typical development group) by two-way ANCOVA.

[illegible]

Table 4. Cont.

| Dietary Intake                               | ASD-Total Group                         |                                                    | TD Group                                |                                                   | All                                     |                                                    | Pair Comparisons      |                       |                       |                       |                       | Sensory Profile Factor | Main Effects            | Interactions   |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|----------------|
|                                              | Typical Performance<br>( <i>n</i> = 11) | Probable + Definite Difference<br>( <i>n</i> = 21) | Typical Performance<br>( <i>n</i> = 27) | Probable + Definite Difference<br>( <i>n</i> = 2) | Typical Performance<br>( <i>n</i> = 38) | Probable + Definite Difference<br>( <i>n</i> = 23) | <i>p</i> <sup>1</sup> | <i>p</i> <sup>2</sup> | <i>p</i> <sup>3</sup> | <i>p</i> <sup>4</sup> | <i>p</i> <sup>5</sup> |                        | Neurodevelopment Factor | SP × ND Factor |
| Vegetable drinks (ml/day)                    | 206.54 ± 378.24                         | 234.52 ± 356.66                                    | 28.70 ± 122.61                          | 0.00 ± 0.00                                       | 80.18 ± 236.45                          | 214.13 ± 346.71                                    | 0.367                 | .                     | 0.365                 | .                     | 0.228                 | NS                     | NS                      | NS             |
| <i>Cereals</i>                               |                                         |                                                    |                                         |                                                   |                                         |                                                    |                       |                       |                       |                       |                       |                        |                         |                |
| Cereals with gluten (g/day)                  | 104.24 ± 105.77                         | 99.81 ± 150.17                                     | 237.04 ± 111.57                         | 230.40 ± 27.44                                    | 198.60 ± 124.48                         | 111.17 ± 148.16                                    | 0.148                 | 0.962                 | 0.152                 | 0.991                 | 0.458                 | NS                     | NS                      | NS             |
| Cereals without gluten (g/day)               | 69.06 ± 71.86                           | 111.35 ± 100.00                                    | 30.84 ± 60.14                           | 20.00 ± 0.00                                      | 41.90 ± 65.16                           | 103.40 ± 98.91                                     | 0.289                 | 0.591                 | 0.755                 | 0.152                 | 0.936                 | NS                     | NS                      | NS             |
| T. Cereals (with and without gluten) (g/day) | 130.15 ± 97.38                          | 173.25 ± 117.86                                    | 235.17 ± 103.72                         | 216.43 ± 6.54                                     | 204.77 ± 111.59                         | 177.00 ± 113.07                                    | <b>0.036</b>          | 0.799                 | 0.060                 | 0.672                 | 0.419                 | NS                     | NS                      | NS             |
| <i>Meats, fish, and eggs</i>                 |                                         |                                                    |                                         |                                                   |                                         |                                                    |                       |                       |                       |                       |                       |                        |                         |                |
| Meat (g/day)                                 | 45.36 ± 29.14                           | 36.60 ± 25.70                                      | 31.07 ± 18.75                           | 39.50 ± 0.70                                      | 35.21 ± 22.80                           | 36.85 ± 24.52                                      | <b>0.047</b>          | 0.632                 | 0.912                 | 0.153                 | 0.578                 | NS                     | NS                      | NS             |
| Minced meat (g/day)                          | 14.74 ± 16.79                           | 50.11 ± 106.49                                     | 17.97 ± 13.92                           | 40.00 ± 0.00                                      | 17.04 ± 14.65                           | 49.23 ± 101.57                                     | 0.247                 | 0.268                 | 0.203                 | 0.291                 | 0.130                 | NS                     | NS                      | NS             |
| Chicken (g/day)                              | 26.54 ± 13.50                           | 49.61 ± 53.01                                      | 29.48 ± 19.88                           | 30.00 ± 14.14                                     | 28.63 ± 18.14                           | 47.91 ± 50.95                                      | 0.137                 | 0.739                 | 0.594                 | 0.469                 | 0.313                 | NS                     | NS                      | NS             |
| Pork (g/day)                                 | 7.03 ± 12.09                            | 10.73 ± 20.28                                      | 2.62 ± 3.71                             | 1.90 ± 1.55                                       | 3.90 ± 7.30                             | 9.96 ± 19.50                                       | 0.736                 | 0.899                 | 0.550                 | 0.998                 | 0.959                 | NS                     | NS                      | NS             |
| Milanesa with gluten (g/day)                 | 11.12 ± 10.91                           | 16.58 ± 40.59                                      | 16.10 ± 12.64                           | 16.12 ± 19.62                                     | 14.66 ± 12.24                           | 16.54 ± 38.93                                      | 0.179                 | 0.586                 | 0.632                 | 0.330                 | 0.859                 | NS                     | NS                      | NS             |
| Milanesa without gluten (g/day)              | 1.70 ± 2.37                             | 8.14 ± 15.70                                       | 1.33 ± 4.48                             | 0.00 ± 0.00                                       | 1.44 ± 3.96                             | 7.43 ± 15.15                                       | 0.118                 | .                     | 0.517                 | .                     | 0.342                 | NS                     | NS                      | NS             |
| Eggs (g/day)                                 | 27.81 ± 34.52                           | 42.60 ± 64.41                                      | 28.08 ± 19.23                           | 17.79 ± 8.06                                      | 28.01 ± 24.12                           | 41.34 ± 61.89                                      | 0.374                 | 0.762                 | 0.282                 | 0.817                 | 0.849                 | NS                     | NS                      | NS             |
| <i>Fish</i>                                  |                                         |                                                    |                                         |                                                   |                                         |                                                    |                       |                       |                       |                       |                       |                        |                         |                |
| Fresh fish (g/day)                           | 0.00 ± 0.00                             | 0.03 ± 0.17                                        | 7.133 ± 5.33                            | 23.00 ± 24.04                                     | 5.06 ± 5.54                             | 2.03 ± 8.37                                        | .                     | 0.168                 | .                     | .                     | .                     | NS                     | .                       | .              |
| Canned fish (g/day)                          | 0.00 ± 0.00                             | 0.00 ± 0.00                                        | 5.33 ± 10.14                            | 11.20 ± 0.00                                      | 0.97 ± 3.22                             | 2.72 ± 7.34                                        | .                     | 0.892                 | .                     | .                     | 0.892                 | NS                     | .                       | .              |
| Fish (fresh and canned) (g/day)              | 0.00 ± 0.00                             | 0.04 ± 0.17                                        | 12.47 ± 10.65                           | 34.20 ± 24.04                                     | 8.86 ± 10.60                            | 3.01 ± 11.09                                       | .                     | 0.085                 | .                     | .                     | .                     | NS                     | .                       | .              |
| T. food source of proteins (g/day)           | 147.08 ± 62.82                          | 227.20 ± 127.38                                    | 158.73 ± 50.84                          | 189.31 ± 54.88                                    | 155.36 ± 53.96                          | 223.90 ± 122.50                                    | <b>0.034</b>          | 0.515                 | 0.423                 | 0.905                 | 0.112                 | NS                     | NS                      | NS             |
| <i>Butter, ghee, and oils</i>                |                                         |                                                    |                                         |                                                   |                                         |                                                    |                       |                       |                       |                       |                       |                        |                         |                |
| Butter (g/day)                               | 0.43 ± 0.76                             | 1.39 ± 5.43                                        | 2.86 ± 5.45                             | 3.90 ± 5.51                                       | 2.16 ± 4.72                             | 1.60 ± 5.36                                        | 0.674                 | 0.388                 | 0.637                 | 0.525                 | 0.335                 | NS                     | NS                      | NS             |
| Ghee (g/day)                                 | 0.29 ± 0.67                             | 1.47 ± 5.46                                        | 0.06 ± 0.27                             | 0.00 ± 0.00                                       | 0.13 ± 0.43                             | 1.34 ± 5.22                                        | 0.605                 | .                     | .                     | .                     | .                     | NS                     | .                       | .              |
| Coconut oil (g/day)                          | 5.43 ± 11.54                            | 5.80 ± 8.96                                        | 1.02 ± 3.62                             | 0.00 ± 0.00                                       | 2.30 ± 7.02                             | 5.30 ± 8.70                                        | 0.436                 | .                     | <b>0.049</b>          | .                     | 0.650                 | NS                     | **                      | NS             |

Table 4. Cont.

| Dietary Intake                | ASD-Total Group              |                                         | TD Group                     |                                        | All                          |                                         | Pair Comparisons |       |       |       |       | Sensory Profile Factor | Main Effects            | Interactions   |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------------------------|----------------|
|                               | Typical Performance (n = 11) | Probable + Definite Difference (n = 21) | Typical Performance (n = 27) | Probable + Definite Difference (n = 2) | Typical Performance (n = 38) | Probable + Definite Difference (n = 23) | $p^1$            | $p^2$ | $p^3$ | $p^4$ | $p^5$ |                        | Neurodevelopment Factor | SP × ND Factor |
| Oil (g/day)                   | 22.08 ± 16.19                | 23.81 ± 17.05                           | 18.95 ± 12.34                | 37.50 ± 17.67                          | 19.86 ± 13.41                | 25.00 ± 17.15                           | 0.576            | 0.150 | 0.984 | 0.283 | 0.129 | NS                     | NS                      | NS             |
| T. food source of fat (g/day) | 28.24 ± 24.25                | 33.67 ± 20.53                           | 22.91 ± 14.70                | 41.40 ± 23.19                          | 24.45 ± 17.79                | 34.34 ± 20.31                           | 0.745            | 0.189 | 0.858 | 0.250 | 0.194 | NS                     | NS                      | NS             |

Results expressed as means ± SD. Statistically significant differences (indicated in bold,  $p < 0.05$ ; adjusted for birth weight, nutritional status, with/without diet): (a) Two-way ANCOVA, comparisons between: <sup>1</sup> typical performance and probable + definite deference in ASD group, <sup>2</sup> typical performance and probable + definite deference in TD group, <sup>3</sup> typical performance in ASD and TD, <sup>4</sup> probable + definite deference in ASD and TD, \* significant main effect of sensory profile group factor, \*\* significant main effect of neurodevelopment factor (significant main effects and interactions are described in result section), NS: no significant; (b) One-way ANCOVA, comparison between <sup>5</sup> typical performance and probable + definite deference in all participants. ASD: autism spectrum disorder; ASD-total group: children with ASD with and without restricted diet, TD: typical development, T: total, SP: sensory profile, ND: neurodevelopment, All: ASD + TD children.

#### 4. Discussion

The aim of this study was to describe and analyze dietary intake in children with and without autism, in relation to their nutritional status and sensory sensitivity. Our main findings were that children with ASD who presented a higher sensory sensitivity (probable or definite difference in their sensory profile) had a lower intake of total dairy products and a higher intake of total cereals and protein foods than TP children with ASD.

Considering food intake exclusively, in agreement with our results after a systematic review of cohort studies, Ristory et al. showed that there was no difference in the intake of protein foods between ASD and TD groups [3]. However, regarding fish intake, we observed that children with ASD consumed a significantly lower amount of fresh and canned fish than TD group. Notably, another study analyzing food consumption and eating behavior in autistic children and their typically developing peers found that 27% of children with autism never ate fish [1]. This lower consumption may be worrisome because a higher fish intake has been associated with better cognitive function in adolescents in a Dutch study [14]. Likewise, Plaza-Díaz et al. outlined that low docosahexaenoic acid (DHA) levels have been associated with damaged language and motor skills in children, but they found not significant differences in the average daily intake of the fatty acids eicosapentaenoic (EPA) + (DHA) contained in fish between the ASD and control group, perhaps due to a traditionally higher consumption of fish in Spain than in other countries [15].

Furthermore, even though there is no conclusive evidence proving an improvement of ASD symptom management in children on the GFCF diet, it is currently one of the most popular interventions [16]. A gluten-free diet consists in the exclusion of all foods containing wheat, barley, or rye as well as all flours, bread, pasta, and other bakery products made from these cereals; while a casein-free diet is based on avoiding dairy products such as milk, yogurt, cheese, butter, cream, or ice cream, among others [17]. As expected, we observed a lower consumption of dairy products and cereals with gluten in those autistic children who were on the GFCF diet, and a lower intake of gluten and casein in the ASD total group (ASD-d + ASD-no diet) in comparison with TD participants.

Consequently, a higher intake of vegetable drinks in the ASD group on a GFCF diet than among non-dieters may be due to the fact that they used such drinks as a substitute for dairy [18,19]. It is still unclear whether vegetable drink consumption may be associated with any beneficial effects on health [18]. These beverages are liquid-based extracts of nuts, oilseeds, legumes, cereals, and pseudo-cereals that simulate cow milk appearance and consistency but are known to have different nutrient properties and bioavailability [20]. Some of the industrialized beverages could be calcium-fortified, but as compared to milk, the nutritional profile of vegetable substitutes is generally low in proteins, vitamins (B2, D, E), mineral content (especially calcium), and saturated fat acid levels (except for coconut milk); and regarding their content of carbohydrates, they show good energy levels, similar to whole milk [18].

In line with our results, analyses involving nutritional data suggested children with ASD had a significantly lower consumption of calcium and vitamin D compared to their TD peers with bad consequences in bone and skeletal health [21,22]. In a cross-sectional study with 738 ASD children and 302 typically developing children recruited in China, those with ASD consumed less milk and fewer dairy products than TD ones [23]. In our research, we analyzed this characteristic also discriminating by nutritional status. Children with a normal weight and ASD showed a lower consumption of milk and yogurt and total dairy products, in comparison with those with a normal weight in the TD group, which was mainly driven by the ASD group dieters. It is worth noting that a low consumption, or even the elimination, of milk and other dairy products could result in calcium deficiency due to an intake below recommended levels [24].

As far as fat consumption is concerned, we found that ASD-diet had a higher intake of ghee and total fat intake than the ASD-not diet group. A higher consumption of ghee might be the result of it being considered a casein-free food derivative of butter and one of the options of a GFCF diet [25]. In addition, ghee is commonly used in Indian and Pakistani

cooking, and has played an integral role as a homeopathic treatment for learning and memory enhancement [26]. However, there is a lack of scientific data to support this claim. Moreover, the intake of coconut oil showed a significant interaction between the nutritional status groups and the neurodevelopment factor. We observed a higher intake of coconut oil in those with a normal weight and ASD in comparison with TD with a normal weight. This could be explained by the fact that the ASD-diet group consumed a high amount of coconut oil. The use of this fat for treating epilepsy with ketogenic diets might be a reason for parents of children on an ASD-diet to consider it as beneficial for this common comorbidity [26,27]. However, the same randomized controlled trials show that coconut oil intake increases low-density lipoprotein cholesterol and total cholesterol when compared with other vegetable oils, and the current recommendation is to include it only within 10% of total caloric intake [28]. Interestingly, children with normal nutritional status in the TD group consumed significantly less coconut oil than the excess weight group, which is consistent with a broad range of studies proving a link between consumption of saturated fatty acids and an increase in fat cell (adipocyte) size and number [29].

Regarding the nutritional status, we found no significant difference of participants with ASD and TD. Nevertheless, in a meta-analysis of epidemiological studies examining the association between obesity, overweight, and ASD, the prevalence of obesity was significantly higher in individuals with ASD than in controls [27]. According to the authors, this could be related to eating disorders, such as food selectivity and more time spent on sedentary activities [27]. Its discrepancy with our results may be due to the small sample size of the population we studied.

Additionally, some studies report that ASD children have strong food preferences, and alterations in sensory processing—especially in tactile, taste, and smell sensitivity—may have an impact on health and nutritional status [3]. Coincidentally, upon applying the SSP questionnaire, we found that the participants with ASD had a lower score in ‘taste/smell sensitivity’ than TD participants, which points to a higher sensitivity in children with autism. The ASD group also showed higher tactile sensitivity, under responsive/seeks sensation, auditory filtering, and total sensory profile scores. A study using the same questionnaire for 281 children with ASD compared to age-matched peers with typical development reported similar results, showing ASD children’s greater sensitivity in the same aspects [28].

Sensory sensitivity has been suggested as a possible mechanism to explain food selectivity in children with ASD [4]. Among all participants (ASD + TD), those who have PD + DD had a lower mean intake of cheese than TP group, and the sensory profile factor had a significant main effect on cheese intake. On this topic, we observed that children with ASD and PD + DD (more sensitivity), consumed lower milk and yogurt, and fewer total dairy products, and higher total cereals with and without gluten, and protein foods than TP children with ASD. No difference was found in the short sensory profile between dieters and non-dieters, but as was expected ASD-t group had a higher sensory sensitivity than TD. Furthermore, this sensitivity was related to a lower dairy consumption and a higher intake of protein foods and cereals; however, Zimmer et al. described a lower intake of proteins in selective eaters with ASD [21]. Therefore, sensitivity could be considered an influencing factor in the consumption of these foods.

Nonetheless, we also have found a greater consumption of non-traditional foods—such as different vegetable drinks, ghee, or coconut oil—in children on a GFCF diet. Therefore, it is important to determine their consumption and characteristics in order to assess diet quality for optimal growth and development, and to provide a proper nutritional treatment and follow-up, considering factors that may affect their dietary intake, such as sensory sensitivity. It is important to have a good knowledge of the different diets that children and adolescents with ASD are following to continue to study them and if it covers the recommended nutritional intakes so that health workers can provide scientific information in this regard. This finding attests once more to the need for personalized dietary recommendations for ASD [27,28].

The limitations of this study were problems inherent to the use of FFQ, since it is not a specific tool designed to address food consumption in children with autism. Quantities of consumed food are often estimated by caregivers rather than accurately measured, and reporting by parents might be biased towards a healthier diet. In addition, the small sample size has limited the results of the study. However, as far as we know, there are no previous studies providing information on these children's nutritional status, food intake, and sensory profile as compared to neurotypical ones. We therefore think that this study may be an important contribution to increase knowledge on these topics.

## 5. Conclusions

To conclude, this study found differences in the intake of some food groups as per the sensory sensitivity and nutritional status grouping criteria between ASD and TD children. Predictably, we observed higher sensitivity in the ASD group in comparison to TD ones, while nutritional status showed no significant difference between both groups. Our findings also show a dietary difference in the intake not only of total dairy and cereals (with or without gluten), but also of other foods—such as vegetable drinks, ghee, coconut oil, and total foods' source of fat—between the ASD-diet and ASD-no diet groups, with higher consumption in the ASD-diet group. Additionally, there was a higher intake of total dairy, total cereals, fish, and butter, and a lower mean intake of coconut oil in TD ones than in ASD total group. Our results have therefore given us a deeper knowledge of food consumption in this population and could be linked to the causes of nutritional deficiencies presented in children with ASD, although further research with a larger sample size is needed to continue to investigate connections among food intake, nutritional status, and sensory sensitivity, find out if they meet the nutritional requirements, and understand the causes to carry out intervention strategies if required with important implications for child health.

**Author Contributions:** P.M.D.: methodology, data curation, formal analysis, investigation, writing—original draft preparation, and editing. M.G.: conceptualization, methodology, formal analysis, supervision, and review. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by R&D Investment Program, ICEX Spain.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethic Committee of the School of Nutrition (Universidad de la República, Uruguay) and registered with the Ministry of Health of Uruguay (no. 282599).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the parents of the children to publish this paper.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank families for their collaboration, the School of Nutrition, *Universidad de la República* (Uruguay), for lending us their scale and height rod, as well as the *Agencia Nacional de Investigación e Innovación* (ANII) for the grant to Paula Mendive.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Diolordi, L.; del Balzo, V.; Bernabei, P.; Vitiello, V.; Donini, L.M. Eating habits and dietary patterns in children with autism. *Eat Weight Disord.* **2014**, *19*, 295–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Doreswamy, S.; Bashir, A.; Guarecuco, J.E.; Lahori, S.; Baig, A.; Narra, L.R.; Patel, P.; Heindl, S.E. Effects of Diet, Nutrition, and Exercise in Children with Autism and Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *Cureus* **2020**, *12*, e12222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ristori, M.V.; Quagliarello, A.; Reddel, S.; Ianiro, G.; Vicari, S.; Gasbarrini, A.; Putignani, L. Autism, Gastrointestinal Symptoms and Modulation of Gut Microbiota by Nutritional Interventions. *Nutrients* **2019**, *11*, 2812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Cermak, S.A.; Curtin, C.; Bandini, L.G. Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders. *J. Am. Diet Assoc.* **2010**, *110*, 238–246. [\[CrossRef\]](#)
5. Saravia, L.; González-Zapata, L.I.; Rendo-Urteaga, T.; Ramos, J.; Collese, T.S.; Bove, I.; Delgado, C.; Tello, F.; Iglesia, I.; Sousa, E.D.G.; et al. Development of a Food Frequency Questionnaire for Assessing Dietary Intake in Children and Adolescents in South America. *Obesity* **2018**, *26* (Suppl. 1), S31–S40. [\[CrossRef\]](#)
6. Leader, G.; Abberton, C.; Cunningham, S.; Gilmartin, K.; Grudzien, M.; Higgins, E.; Joshi, L.; Whelan, S.; Mannion, A. Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Nutrients* **2022**, *14*, 1471. [\[CrossRef\]](#)
7. Ranjan, S.; Nasser, J.A. Nutritional Status of Individuals with Autism Spectrum Disorders: Do We Know Enough? *Adv. Nutr.* **2015**, *6*, 397–407. [\[CrossRef\]](#)
8. Peretti, S.; Mariano, M.; Mazzocchi, C.; Mazza, M.; Pino, M.C.; Di Pianella, A.V.; Valenti, M. Diet: The keystone of autism spectrum disorder? *Nutr. Neurosci.* **2019**, *22*, 825–839. [\[CrossRef\]](#)
9. Williams, Z.J.; Failla, M.D.; Gotham, K.O.; Woynarowski, T.G.; Cascio, C. Psychometric Evaluation of the Short Sensory Profile in Youth with Autism Spectrum Disorder. *J. Autism. Dev. Disord.* **2018**, *48*, 4231–4249. [\[CrossRef\]](#)
10. Wiggins, L.D.; Rice, C.E.; Barger, B.; Soke, G.N.; Lee, L.-C.; Moody, E.; Edmondson-Pretzel, R.; Levy, S.E. DSM-5 criteria for autism spectrum disorder maximizes diagnostic sensitivity and specificity in preschool children. *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* **2019**, *54*, 693–701. [\[CrossRef\]](#)
11. Ulijaszek, S.J.; Kerr, D.A. Anthropometric measurement error and the assessment of nutritional status. *Br. J. Nutr.* **1999**, *82*, 165–177. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr. Suppl.* **2006**, *450*, 76–85.
13. Rendo-Urteaga, T.; Saravia, L.; Sadalla Collese, T.; Monsalve-Alvarez, J.M.; González-Zapata, L.I.; Tello, F.; Martínez-Oliván, B.; Torres-Leal, F.L.; Moreno, L.A.; De Moraes, A.C.F.; et al. Reliability and validity of an FFQ for South American children and adolescents from the SAYCARE study. *Public Health Nutr.* **2020**, *23*, 13–21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. de Groot, R.H.; Ouwehand, C.; Jolles, J. Eating the right amount of fish: Inverted U-shape association between fish consumption and cognitive performance and academic achievement in Dutch adolescents. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2012**, *86*, 113–117. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Plaza-Diaz, J.; Flores-Rojas, K.; Torre-Aguilar, M.J.D.L.; Gómez-Fernández, A.R.; Martín-Borreguero, P.; Perez-Navero, J.L.; Gil, A.; Gil-Campos, M. Dietary Patterns, Eating Behavior, and Nutrient Intakes of Spanish Preschool Children with Autism Spectrum Disorders. *Nutrients* **2021**, *13*, 3551. [\[CrossRef\]](#)
16. Alamri, E.S. Efficacy of gluten- and casein-free diets on autism spectrum disorders in children. *Saudi Med. J.* **2020**, *41*, 1041–1046. [\[CrossRef\]](#)
17. Quan, L.; Xu, X.; Cui, Y.; Han, H.; Hendren, R.L.; Zhao, L.; You, X. A systematic review and meta-analysis of the benefits of a gluten-free diet and/or casein-free diet for children with autism spectrum disorder. *Nutr. Rev.* **2022**, *80*, 1237–1246. [\[CrossRef\]](#)
18. Verduci, E.; D’Elios, S.; Cerrato, L.; Comberiati, P.; Calvani, M.; Palazzo, S.; Martelli, A.; Landi, M.; Trikamjee, T.; Peroni, D.G. Cow’s Milk Substitutes for Children: Nutritional Aspects of Milk from Different Mammalian Species, Special Formula and Plant-Based Beverages. *Nutrients* **2019**, *11*, 1739. [\[CrossRef\]](#)
19. Aparicio Vizuete, A.; Rodríguez-Rodríguez, E.; Lorenzo Mora, A.M.; Sánchez-Rodríguez, P.; Ortega, R.M.; López-Sobaler, A.M. Myths and fallacies in relation to the consumption of dairy products. *Nutr. Hosp.* **2019**, *36*, 20–24. [\[CrossRef\]](#)
20. Sethi, S.; Tyagi, S.K.; Anurag, R.K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: A review. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 3408–3423. [\[CrossRef\]](#)
21. Zimmer, M.H.; Hart, L.C.; Manning-Courtney, P.; Murray, D.S.; Bing, N.M.; Summer, S. Food variety as a predictor of nutritional status among children with autism. *J. Autism Dev. Disord.* **2012**, *42*, 549–556. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Sharp, W.G.; Berry, R.C.; McCracken, C.; Nuhu, N.N.; Marvel, E.; Saulnier, C.A.; Klin, A.; Jones, W.; Jaquess, D.L. Feeding problems and nutrient intake in children with autism spectrum disorders: A meta-analysis and comprehensive review of the literature. *J. Autism Dev. Disord.* **2013**, *43*, 2159–2173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Zhu, J.; Guo, M.; Yang, T.; Lai, X.; Tang, T.; Chen, J.; Li, L.; Li, T. Nutritional Status and Symptoms in Preschool Children with Autism Spectrum Disorder: A Two-Center Comparative Study in Chongqing and Hainan Province, China. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*, 469. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Mari-Bauset, S.; Llopis-González, A.; Zazpe, I.; Mari-Sanchis, A.; Suárez-Varela, M.M. Nutritional Impact of a Gluten-Free Casein-Free Diet in Children with Autism Spectrum Disorder. *J. Autism Dev. Disord.* **2016**, *46*, 673–684. [\[CrossRef\]](#)
25. Zheng, Z.; Zhang, L.; Li, S.; Zhao, F.; Wang, Y.; Huang, L.; Huang, J.; Zou, R.; Qu, Y.; Mu, D. Association among obesity, overweight and autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11697. [\[CrossRef\]](#)
26. Tomchek, S.D.; Dunn, W. Sensory processing in children with and without autism: A comparative study using the short sensory profile. *Am. J. Occup. Ther.* **2007**, *61*, 190–200. [\[CrossRef\]](#)
27. Vartanian, C. Overview of Nutritional Therapy for Autism Spectrum Disorder. *Adv. Neurobiol.* **2020**, *24*, 527–534.
28. Doeniyas, C. Novel Personalized Dietary Treatment for Autism Based on the Gut-Immune-Endocrine-Brain Axis. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 508, PMID:PMC6700238. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Engin, A. Fat Cell and Fatty Acid Turnover in Obesity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *960*, 135–160.

## ANEXO 3

## DIETARY INTAKE, BODY MASS INDEX, AND GUT BIFIDOBACTERIUM, LACTOBACILLUS, CLOSTRIDIUM AND BACTERIAL DIVERSITY IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER AND TYPICAL DEVELOPMENT

**María Paula Mendive Dubourdieu, Marcela Guerendiain**

Escuela de Nutrición, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

E-mail: mpmendive@nutricion.edu.uy



### Background/Aims:

Some studies have shown the influence of gut microbiota on the nutritional status and the gut-brain axis, but the dietary intake effect is not yet well known. Thus, we studied the relationship between food intake, body mass index (BMI) and bacterial composition of the gut microbiota, in children with and without Autism Spectrum Disorder (ASD).

### Methods:

A descriptive, cross-sectional study was carried out in 65 children [3-12 years; ASD=35, typical development (TD)=30]. A food frequency questionnaire was applied. The ASD group was categorized as gluten and casein free dieters (ASD-d) and non-dieters (ASD-nd). BMI (Kg/m<sup>2</sup>), and Z-score for BMI were determined with Anthro and Anthro plus and categorized into normal weight and excess weight (overweight and obesity). Fecal microbiota composition was analyzed by 16S ribosomal DNA sequencing. Data were analyzed using the SPSS statistical program.

### Results:

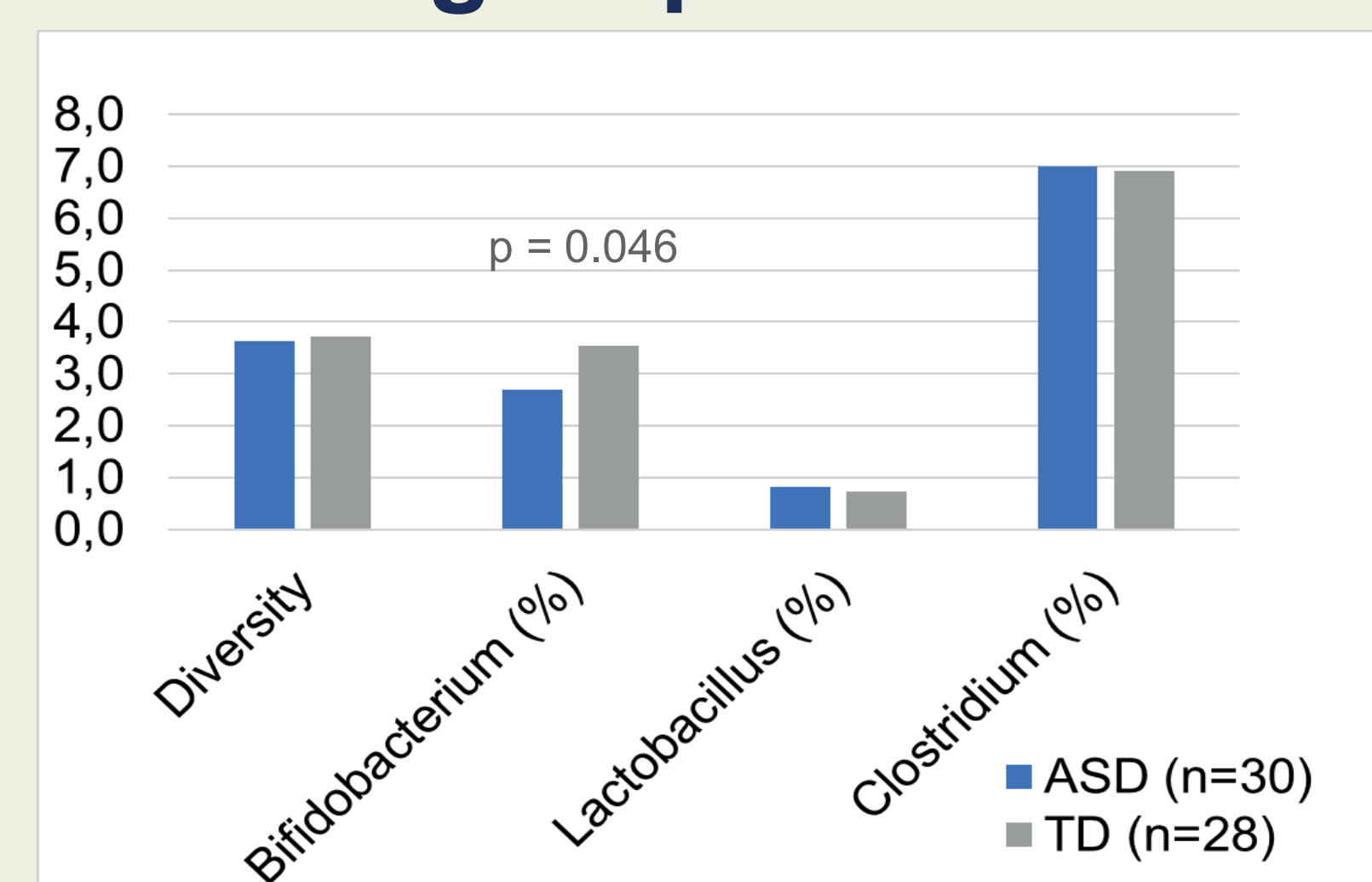
#### Comparison of dietary intake between ASD and TD groups

| Dietary intake                      | ASD-d           | ASD-nd          | p value          | ASD             | TD              | p value          |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| T. Dairy (g/day)                    | 0.71 ± 2.41     | 284.98 ± 275.95 | <b>&lt;0.001</b> | 129.92 ± 232.33 | 401.95 ± 243.96 | <b>&lt;0.001</b> |
| T. Vegetables (g/day)               | 116.83 ± 159.37 | 32.90 ± 37.96   | <b>0.013</b>     | 78.68 ± 126.20  | 56.72 ± 58.20   | 0.854            |
| T. Foods source of proteins (g/day) | 206.05 ± 129.84 | 183.21 ± 98.64  | 0.656            | 195.67 ± 115.53 | 160.84 ± 50.69  | 0.386            |

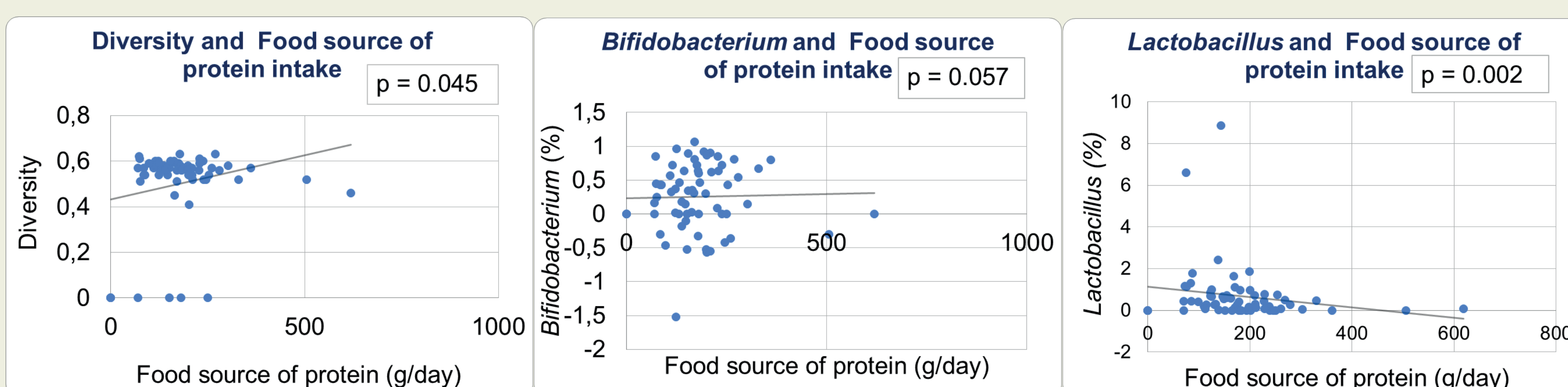
ASD: Autism Spectrum Disorder; ASD-d: dietary intake without gluten and casein; ASD-nd: not diet; TD: Typical Development; T: total. Variables shown as mean ± SD.

Children with normal weight in ASD had a lower dairy intake than children with normal weight in the TD group (p=0.014).

#### Fecal microbiota in ASD and TD groups



#### Food source of protein intake and fecal microbiota in all children (n = 58)



We found a significant relationship between food source of protein intake and bacterial diversity (p=0.045), and with Lactobacillus (p=0.002) adjusted for potential confounders (ASD-d/ASD-nd, BMI, and ASD/TD). The significant association between Bifidobacterium and dairy intake (p=0.036), and with vegetables intake (p=0.024) disappeared when the potential confounders were considered. No relationship was found between BMI and Z-score for BMI, and bacterial composition.

**Conclusion:** These findings confirm that some food intake is related to gut microbiota, neurodevelopment, and nutritional status, so further long-term research is needed to explore these relationships and the effect on health.

**Keywords:** autism, gut microbiota, nutritional status, food intake, gluten and casein free diet.

## ANEXO 4

# ANALES DE Microbiota & Probióticos & Prebióticos

## SUMARIO

### Artículo de Revisión

**XII Workshop Sociedad Española de  
Microbiota, Probióticos y Prebióticos &  
I Congreso Sociedad Iberoamericana de  
Microbiota, Probióticos y Prebióticos**

*Madrid, 15-18 septiembre 2021*

**Documento de consenso sobre la  
microbiota y el uso de probióticos/  
prebióticos en patologías neurológicas y  
psiquiátricas SEMiPyP, SEN, SEPB:  
Decálogo**

daño cerebral aún son desconocidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel del eje microbiota-hígado-cerebro en diferentes estadios del DH.

**Metodología.** Se trabajó con cuatro grupos de DH en ratas Sprague-Dawley macho: un grupo de hígado graso con dieta alta en grasa y colesterol (HFHC), un grupo de DH agudo mediante la administración de tioacetamida (TAA), un grupo con DH crónico (HFHC+TAA) y un grupo control con dieta normal (NC). En todos los grupos experimentales se analizó la histología hepática, el estado cognitivo con pruebas *in vivo*, la actividad metabólica cerebral mediante la medida del citocromo-c-oxidasa y la MI mediante secuenciación del gen ribosómico 16S y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por GC.

**Resultados.** Todos los animales fueron normopeso durante el estudio y sin afectación motora. Se observaron cambios hepáticos con esteatosis y fibrosis en los grupos de DH. A nivel cognitivo, estos grupos mostraron un retraso en la adquisición de la memoria de reconocimiento y de trabajo, que se reflejó en cambios en diferentes áreas de la corteza cerebral. Cambios en diversidad, composición y en los AGCC, fueron observados en la MI de los grupos con DH.

**Conclusiones.** Este trabajo ponen de manifiesto la interrelación del eje hígado-intestino-cerebro. Estos resultados establecen claras dianas de actuación para el desarrollo de estrategias de intervención destinadas a la mejora de los problemas cognitivos asociados al DH a través de la modulación de la MI.

**P12. Papel de las sondas nasogástricas para alimentación enteral en la colonización temprana de niños prematuros.** Jara Pérez J<sup>1</sup>, Moreno Sanz B<sup>2</sup>, Casto Navarro I<sup>1</sup>, Alba Rubio C<sup>1</sup>, Escribano Palomino E<sup>2</sup>, Fernández Álvarez L<sup>1</sup>, Rodríguez Gómez JM<sup>1</sup>, Sáenz de Pipaón M<sup>2</sup>, Orgaz Martín B<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. <sup>2</sup>Hospital Universitario La Paz. Madrid.

**Introducción y objetivos.** Los niños prematuros son generalmente alimentados por vía enteral a través de sondas nasogástricas (SNGs) las cuales podrían servir como vía de entrada de microorganismos. Hasta ahora, los trabajos publicados que relacionan la colonización de las SNGs con la del prematuro se basan en el análisis de muestras de SNGs y heces tomadas sin tener en cuenta un patrón temporal. El objetivo de este trabajo fue estudiar en paralelo la colonización de SNGs y heces de los prematuros durante sus dos primeras semanas de vida.

**Metodología.** Se recogieron muestras de SNGs y heces de 30 prematuros hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) del Hospital Universitario de la Paz (Madrid). Estas se sembraron en 7 medios de cultivo diferentes para el aislamiento y recuento de microorganismos. Los aislados se identificaron mediante la secuenciación parcial del gen 16S rDNA. Finalmente, se realizó un estudio de los perfiles RAPD-PCR de los aislados de la misma especie.

**Resultados.** Se obtuvieron un total de 561 aislados. Las muestras de sondas y heces, correspondientes a las primeras 48 horas de vida mostraron una escasa colonización. Se observó un aumento significativo en la abundancia, diversidad y frecuencia de detección de microorganismos tras 14 días de hospitalización. Además, se observó un paralelismo entre los microorganismos aislados en muestras tomadas simultáneamente de sondas y heces. Estos resultados unidos a los perfiles de RAPD-PCR, sugieren una transferencia bidireccional de bacterias desde el tracto gastrointestinal de los neonatos hacia las sondas y viceversa.

**Conclusiones.** Conocer la colonización de las SNGs en un momento preciso, podría servir para predecir en parte la composición de la población microbiana gastrointestinal de los prematuros en dicho instante. Esto podría guiar el desarrollo de estrategias para minimizar la diseminación de cepas resistentes a antibióticos y la aparición de brotes en UCIN.

**P13. Dietary intake, body mass index, and gut *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* and bacterial diversity in children with autism spectrum disorder and typical development.** Mendive Dubourdieu MP, Guerendiain Margni ME. *Escuela de Nutrición, Universidad de la República. Montevideo (Uruguay).*

**Background/Aims.** Some studies have shown the influence of gut microbiota on the nutritional status and the gut-brain axis, but the dietary intake effect is not yet well known. Thus, we studied the relationship between food intake, body mass index (BMI) and bacterial composition of the gut microbiota, in children with and without autism spectrum disorder (ASD).

**Methods.** A descriptive, cross-sectional study was carried out in 65 children [3-12 years; ASD= 35, typical development (TD)= 30]. A food frequency questionnaire was applied. The ASD group was categorized as gluten and casein free dieters (ASD-d) and non-dieters (ASD-nd). BMI (kg/m<sup>2</sup>), and Z-score for BMI were determined with Anthro and Anthro plus, and categorized into normal weight and excess weight (overweight and obesity). Fecal microbiota composition was analyzed by 16S ribosomal DNA sequencing. Data were analyzed using the SPSS statistical program.

**Results.** Children with ASD had a lower dairy intake (g/d) than TD ones (p< 0.001). The ASD-d group had a higher vegetable intake than ASD-nd ones (p= 0.013). No significant differences were found in food sources of protein intake between ASD and TD groups. Those with TD had a higher relative abundance of *Bifidobacterium* than ASD ones (p= 0.046). We found a significant relationship between food source of protein intake and bacterial diversity (p= 0.045), and with *Lactobacillus* (p= 0.002) adjusted for potential confounders (ASD-d/ASD-nd, BMI, and ASD/TD). The significant association between *Bifidobacterium* and dairy intake (p= 0.036), and with vegetables

intake ( $p=0.024$ ) disappeared when the potential confounders were considered. No relationship was found between BMI and Z-score for BMI, and bacterial composition. Children with normal weight in ASD had a lower dairy intake than children with normal weight in the TD group ( $p=0.014$ ).

**Conclusion.** These findings confirm that some food intake is related to gut microbiota, neurodevelopment, and nutritional status, so further long-term research is needed to explore these relationships and the effect on health.

**P14. La microbiota intestinal como diana terapéutica en pacientes ingresados con infección por COVID-19.** Navarro López V<sup>1</sup>, Ayo González M<sup>2</sup>, Pérez Soto MI<sup>3</sup>, Hernández Belmonte A<sup>3</sup>, Terol Esteve A<sup>4</sup>, Navarro Moratalla L<sup>5</sup>, Ruzafa Costas B<sup>5</sup>, Núñez Delegido E<sup>5</sup>, Sánchez Pellicer P<sup>5</sup>, Agüera Santos JG<sup>5</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario del Vinalopó, Elche. <sup>2</sup>Servicio UHD, Hospital Universitario de Torrevieja, Alicante. <sup>3</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital del Vinalopó, Elche. <sup>4</sup>Hospital Universitario de Torrevieja, Alicante. <sup>5</sup>Grupo MiBioPath, UCAM Murcia.

**Introducción/Objetivos.** El coronavirus SARS-CoV2, agente causal de la enfermedad Covid-19, es un virus ARN de la familia coronaviridae. Infecta al hospedador gracias a su gran afinidad por el receptor ECA-2, que, además de en los neumocitos, se encuentra altamente expresado en las células epiteliales intestinales. Este fenómeno, explica la sintomatología digestiva y la presencia de partículas virales en muestras de heces. Además, ha sido descrito el fenómeno de disbiosis intestinal en estos pacientes. El objetivo del estudio fue evaluar el impacto de un preparado probiótico sobre la evolución natural de la infección, así como la eficacia en el control de síntomas digestivos (SD) y totales (ST) en pacientes hospitalizados.

**Metodología.** Estudio de intervención caso y control, prospectivo y abierto con un grupo comparador no sometido a la intervención, a través de la administración oral de un preparado probiótico durante 30 días. Se monitorizaron datos clínicos de una muestra de 41 pacientes con diagnóstico positivo de infección por SARS-CoV2.

**Resultados.** En el grupo con tratamiento probiótico se observó una disminución en el número de pacientes con SD y ST comparando con el grupo control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en síntomas aislados como la dispepsia ( $p=0,015$ ), náuseas/vómitos ( $p=0,038$ ) y dolor osteomuscular ( $p=0,028$ ). La media del número total de SD y ST también fue menor en el grupo sometido a intervención. Así pues, mejora el porcentaje de pacientes que resuelven síntomas digestivos (72,7% vs 46,7%) y el total de síntomas resueltos (88,55% vs 70,82%), encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el índice de mejora en ST ( $p=0,027$ ).

**Conclusiones.** El preparado demostró una mejora clínicamente relevante en los síntomas descritos, planteándose como

terapia coadyuvante en el tratamiento de síntomas persistentes tras COVID-19 y en la morbilidad de estos pacientes. Como probable mecanismo de acción se plantea una modulación de la disbiosis intestinal tras la infección.

**P15. Mejora del dolor crónico en ratones con sobrepeso tras la administración de un prebiótico.** Arboleya S<sup>1</sup>, Burokas A<sup>2</sup>, Rinkunaite I<sup>3</sup>, Baltriukiene D<sup>3</sup>, Bukelskiene V<sup>3</sup>, Stanton C<sup>4</sup>, Gueimonde M<sup>1</sup>, Maldonado R<sup>2</sup>, Martin M<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Asturias. <sup>2</sup>Laboratori de Neurofarmacologia. Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona. <sup>3</sup>Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University, Lithuania. <sup>4</sup>APC Microbiome Institute, University College Cork, Ireland; Teagasc Food Research Centre, Biosciences Department, Moorepark, Ireland.

**Introducción/Objetivo.** El sobrepeso y la obesidad son problemas graves de salud pública, con alto riesgo de mortalidad y comorbilidades asociadas. El dolor crónico es más frecuente y severo en estos individuos, por lo que existe una necesidad de buscar terapias que ayuden a mitigarlo. La microbiota intestinal (MI) juega un papel crítico en la salud, y a través del eje intestino-cerebro ejerce funciones a nivel del sistema nervioso, por lo que se ha propuesto como una diana de actuación en trastornos metabólicos y/o neurológicos. Los prebióticos son conocidos por su efecto modulador de la MI. En este trabajo, el objetivo fue evaluar el efecto de un prebiótico en el desarrollo del dolor crónico inducido por el sobrepeso en un modelo animal.

**Metodología.** Cuatro grupos de ratones macho C57Bl6/J ( $n=10$ /grupo) recibieron dos tipos de dieta: 2 grupos dieta hipercalórica (HFD) y 2 grupos dieta control (CD). Un grupo de cada condición fue administrado con un prebiótico en el agua de bebida durante la duración del experimento (8 semanas). Se evaluó el desarrollo de alodinia mecánica e hiperalgia térmica con diferentes pruebas *in vivo*, se realizaron análisis bioquímicos y se analizó la MI mediante secuenciación del gen ribosómico 16S.

**Resultados.** La HFD indujo sobrepeso y desarrollo de dolor crónico en los ratones. La administración del prebiótico atenuó el peso corporal, tuvo efectos positivos sobre hormonas metabólicas y redujo el desarrollo del dolor inducido por el sobrepeso. La composición de la MI se vio alterada por la HFD y modulada por el prebiótico. Algunos grupos microbianos se asociaron con una menor respuesta al dolor.

**Conclusiones.** Los resultados muestran el efecto positivo de los prebióticos en el desarrollo del dolor inducido por el sobrepeso, pudiendo actuar la MI como mediador. Este trabajo fortalece el papel de la MI como diana de actuación para mejorar trastornos metabólicos del eje intestino-cerebro.

## ANEXO 5

# RELATIONSHIP BETWEEN NUTRITIONAL STATUS AND INTESTINAL MICROBIOTA OF SCHOOL AGE CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER



Paula Mendive Dubourdieu<sup>1\*</sup>, Marcela Guerendiain<sup>2</sup>, Gianfranco Grompone, Ilena Carzoglio

<sup>1</sup>Education Department, Nutrition School; <sup>2</sup> Research Area, Nutrition School  
Universidad de la República, Montevideo, Uruguay  
\*e-mail: paula.mendive@gmail.com



## BACKGROUND/AIMS

The study of the role of intestinal microbiota in human health and disease has emerged in recent years. Some studies have shown the influence of gut microbiota on the nutritional status affecting metabolic pathways as well as the gut-brain axis. The current study was intended to understand the relationship of the nutritional status and bacterial composition of the gut microbiota in children with autism spectrum disorder (ASD).

## MATERIALS AND METHODS

We included a total of 14 children aged 2 to 12 years, diagnosed with Autism Spectrum Disorder, from Montevideo, Uruguay. Bacterial microbiota composition was studied by PCR method. The samples were collected on two separate days (at least 12 hours apart) and the specimen was received within 7 days of the first collection. An anthropometric assessment, including weight, height, body mass index (BMI) and standard deviation score (SDS), was performed with Anthro and Anthro plus (WHO). Children were classified into normal weight and overweight, and data were statistically analyzed by SPSS program.

## RESULTS

A total of 14,3% of the children were overweight while the others were normal weight. We found an inverse relationship between *Clostridium* and BMI (-0.660,  $p=0.010$ ), and between *Enterococcus* and SDS of weight for height (-0.847,  $p=0.016$ ). Moreover, *Bifidobacterium* presented a positive correlation with weight (0.601,  $p=0.023$ ) and SDS of weight for height (0.813,  $p=0.026$ ). In bacterial composition, no significant differences were found between children with normal weight and overweight.

### ANTHROPOMETRIC CHARACTERISTICS

| Parameters               | N  | Mean  | Standard deviation |
|--------------------------|----|-------|--------------------|
| Age (years)              | 14 | 4.57  | 2.95               |
| Weight (Kg)              | 14 | 20.04 | 6.81               |
| Height (m)               | 14 | 1.09  | 0.17               |
| BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) | 14 | 16.61 | 1.88               |
| SDS/ WH                  | 7  | 0.92  | 1.82               |

### CORRELATION BETWEEN AMOUNT OF BACTERIA AND ANTHROPOMETRY

| Bacteria            | Weight | BMI     | SDS/BA   | SDS/WH  |
|---------------------|--------|---------|----------|---------|
| Clostridium spp     | 0.119  | -0.660* | -0.662** | -0.446  |
| Enterococcus spp    | -0.72  | -0.479  | -0.456   | -0.847* |
| Lactobacillus spp   | 0.44   | 0.029   | -0.124   | -0.121  |
| Bifidobacterium spp | 0.601* | 0.461   | 0.444    | 0.813*  |
| Escherichia coli    | 0.406  | -0.006  | 0.053    | 0.99    |



Results expressed as standardized coefficients.

Statistically significant difference \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$

BMI: Body Mass Index.

SDS/BA: Standard deviation score of BMI for age.

SDS/WH: Standard deviation score of weight for height.

## CONCLUSIONS

Through the analysis of gut microbiome from faecal samples, we observed lower levels of bacteria of the phylum *Firmicutes* in children with autism spectrum disorder who have a greater body weight adjusted to their height. However, *Bifidobacterium*, belonging to the *Actinobacter* phylum, appeared in greater abundance in children when the weight increases. Several gut dysbiosis studies in ASD reported lower levels of *Firmicutes* with a relatively higher abundance of *Bacteroidetes* than neurotypical children. In our study we observed that this characteristic may vary according to the nutritional status of children.

**Keywords:** autism, gut microbiota, nutritional status

## ANEXO 6



TURKISH JOURNAL OF

# Gastroenterology

OFFICIAL JOURNAL OF THE TURKISH SOCIETY OF GASTROENTEROLOGY



## Proceedings of the World Congress of Gastroenterology

21-24 September 2019, İstanbul

R. A, 15-year-old black, male, presented with a history of two years of abdominal mass growth, of insidious onset, slow and painless. On objective examination he had a distended, asymmetrical abdomen with irregular hepatomegaly 10 cm below the costal border, smooth surface, hard consistency, painless. Analytically normal alpha-fetoprotein and negative for hepatitis B and C. Ultrasonography and CT scan of the abdomen revealed presence of a hyperechogenic and lobulated lesion, solid, with tumor aspect, in relation to left lobe of the liver. Cytology revealed carcinoma and immunohistochemistry expresses Hep-Parl, arginase, glutamine synthetase, CD68 and CK7. He was submitted to exploratory laparotomy for left lobe hepatectomy, where a multilobulated mass was identified in the left lobe of the liver with invasion of the falciform ligament, without criteria for hepatectomy and biopsy of the nodules was performed. He performed 6 cycles of chemotherapy with Adriamycin and until then with a stationary evolution. FHCC is a histological variant of classical HCC, characterized by presenting non-specific symptoms as in the case described. HepPar-1, CK7 and CD68 are used for diagnosis as well FISH. The basis of treatment is complete surgical resection. It has a better prognosis than typical HCC, due to the younger age of presentation and absence of cirrhosis. It calls our attention the long time of evolution, the age of the patient, the fact that it is the first case diagnosed for us, which is why we decided to share this case in order to have more international subsidies on the management of it.

**Keywords:** Carcinoma, fibrolamellar, diagnostic

#### PP-170

### **Relationship between nutritional status and intestinal microbiota of school age children with autism spectrum disorder**

María Paula Mendive Dubourdieu, Marcela Guerendiain, Gianfranco Grompone, Ileana Carzoglio

School Nutrition, University of the Republic, Uruguay

**Background/Aims:** The study of the role of intestinal microbiota in human health and disease has emerged in recent years. Some studies have shown the influence of gut microbiota on the nutritional status affecting metabolic pathways as well as the gut-brain axis. The current study was intended to understand the relationship of the nutritional status and bacterial composition of the gut microbiota in children with autism spectrum disorder (ASD).

**Materials and Methods:** We included a total of 14 children aged 2 to 12 years, diagnosed with Autism Spectrum Disorder, from Montevideo, Uruguay. Bacterial microbiota composition was studied by PCR method. The samples were collected on two separate days (at least 12 hours apart) and the specimen was received within 7 days of the first collection. An anthropometric assessment, including weight, height, body mass index (BMI) and standard deviation score (SDS), was performed with Anthro and Anthro plus (WHO). Children were classified into normal weight and overweight, and data were statistically analyzed by SPSS program.

**Results:** A total of 14,3% of the children were overweight while the others were normal weight. We found an inverse relationship between *Clostridium* and BMI ( $-0.660$ ,  $p=0.010$ ), and between *Enterococcus* and SDS of weight for height ( $-0.847$ ,  $p=0.016$ ). Moreover, *Bifidobacterium* presented a positive correlation with weight ( $0.601$ ,  $p=0.023$ ) and weight for height ( $0.813$ ,  $p=0.026$ ). In bacterial composition, no significant differences were found between children with normal weight and overweight.

**Conclusion:** Through the analysis of gut microbiome from faecal samples, we observed lower levels of bacteria of the phylum *Firmicutes* in children with autism spectrum disorder who have a greater body weight adjusted to their height. However, *Bifidobacterium*, belonging to the *Actinobacter* phylum, appeared in greater abundance in children when the weight increases. Several gut dysbiosis studies in ASD reported lower levels of *Firmicutes* with a relatively higher abundance of *Bacteroidetes* than neurotypical children. In our study we observed that this characteristic may vary according to the nutritional status of children.

**Keywords:** Autism, gut microbiota, nutritional status

## ANEXO 7

Milena Alvarez, Vanessa Iglesias, Florencia Noria, Paula Olivera, Yamila Sánchez, Romina Torregiani

Tutora: Prof. Adj. Paula Mendive, MSc. Co-tutora: Ay. Lic. Marisabel Charlo

Área de investigación, Escuela de Nutrición Universidad de la República Montevideo Uruguay - Email: mpmendive@nutricion.edu.uy

INTRODUCCIÓN:

El trastorno del espectro autista (TEA) es una condición que se caracteriza por las deficiencias persistentes en la comunicación social, patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses y actividades. Tanto el estado nutricional como la alimentación pueden verse afectadas en estos niños/as debido a los compartimientos alimentarios. Además, es común que sigan regímenes específicos como la dieta libre de gluten y caseína (LGC). Estas dietas han demostrado resultados prometedores en ciertos contextos y se consideran un complemento a los tratamientos tradicionales. Sin embargo, la efectividad y seguridad de la dieta LGC para el TEA sigue siendo un tema en discusión.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar la alimentación y el estado nutricional en niños, niñas y adolescentes con trastorno del espectro autista.

METODOLOGÍA:

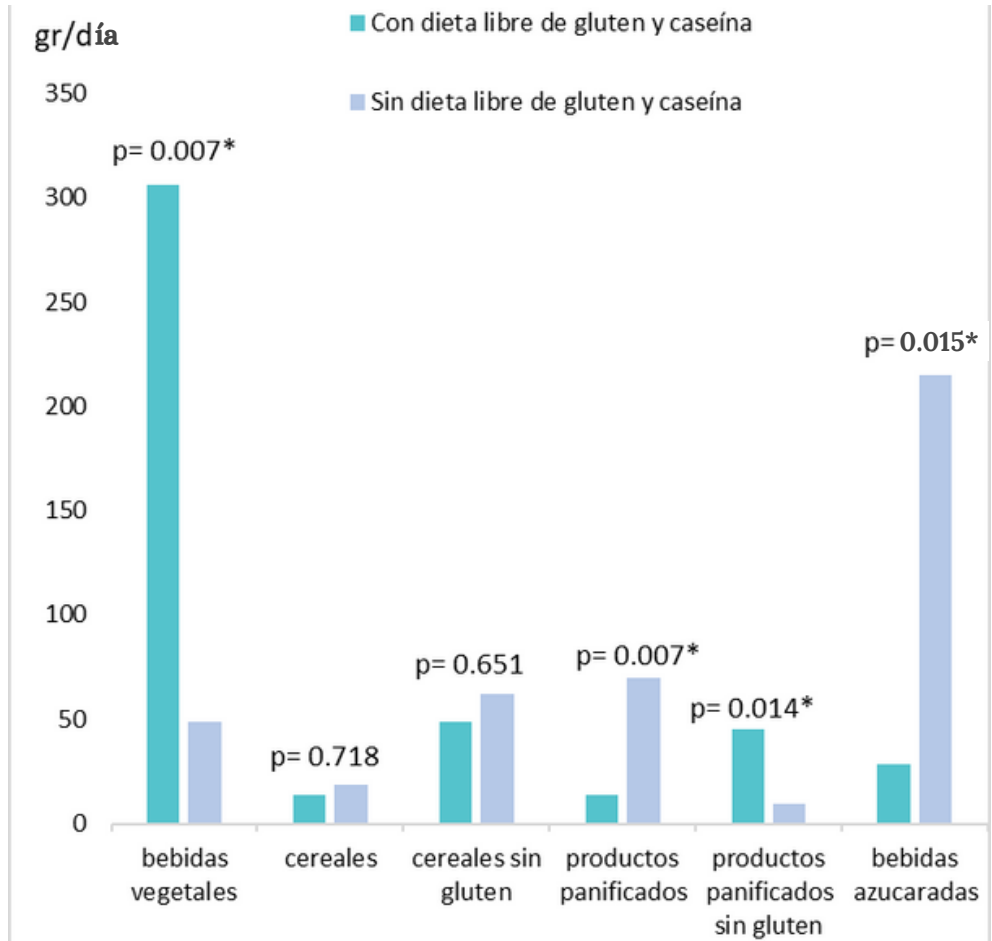
Estudio descriptivo, n=30 niños/as con TEA de 3-12 años. Se cuantificó la ingesta diaria de grupos de alimentos a partir de registros dietéticos de 3 días, determinando la adherencia o no a una dieta LGC. También se evaluó el cumplimiento de recomendaciones nutricionales según las Guías de alimentación para la población uruguaya. Se realizó la clasificación del estado nutricional a partir del índice de masa corporal (IMC) para la edad.

RESULTADOS:

**Características de la población:**

La media de edad fue de 6 ± 2 y un 83% eran de sexo masculino, de la misma una mayoría presenta malnutrición por exceso con un 50%, además también se observa que el normopeso es 37%, seguido de la malnutrición por déficit con un 13%. Se evidencia que el 57% de los participantes llevan una dieta LGC, mientras que el 43% no sigue esta restricción dietética.

Comparación de la ingesta de grupos de alimentos según el tipo de dieta realizada (T de Student).



Asociación entre el tipo de dieta realizada y el cumplimiento de las recomendaciones para determinado grupos de alimentos (Chi - cuadrado).

| Grupo de alimentos | Dieta libre de gluten y caseína | Cumplimiento de recomendaciones de grupos de alimentos |            |         |
|--------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------|------------|---------|
|                    |                                 | No cumple (%)                                          | Cumple (%) | Valor p |
| Carnes             | NO                              | 26,7                                                   | 16,7       | 0,002*  |
|                    | SI                              | 3,3                                                    | 53,3       |         |
| Cereales           | NO                              | 20,0                                                   | 23,3       | 0,5     |
|                    | SI                              | 33,4                                                   | 23,3       |         |
| Pan blanco         | NO                              | 26,7                                                   | 16,7       | 0,4     |
|                    | SI                              | 43,3                                                   | 13,3       |         |

Asociación entre el cumplimiento de recomendaciones de grupos de alimentos y el estado nutricional (Chi - cuadrado).

| Grupo de alimentos | Estado nutricional | Cumplimiento de recomendaciones de grupos de alimentos |        |         |
|--------------------|--------------------|--------------------------------------------------------|--------|---------|
|                    |                    | No cumple                                              | Cumple | Valor p |
| Carnes             | Normopeso          | 15,4                                                   | 26,9   | 0,7     |
|                    | Exceso de peso     | 15,4                                                   | 42,3   |         |
| Cereales           | Normopeso          | 23,1                                                   | 19,2   | 0,7     |
|                    | Exceso de peso     | 38,5                                                   | 19,2   |         |
| Pan blanco         | Normopeso          | 30,8                                                   | 11,5   | 0,7     |
|                    | Exceso de peso     | 34,6                                                   | 23,1   |         |

Relación entre el estado nutricional y el tipo de dieta realizada (Chi - cuadrado).

| Estado nutricional              |           |           |                |
|---------------------------------|-----------|-----------|----------------|
| Dieta libre de gluten y caseína | Bajo peso | Normopeso | Exceso de peso |
| SI                              | 3,3       | 20,0      | 20,0           |
| NO                              | 10,0      | 16,7      | 30,0           |
| Valor p: 0,5                    |           |           |                |

CONCLUSIÓN:

Se destacan diferencias en el consumo de ciertos grupos de alimentos entre los que realizan la dieta LGC y los que no, así como una asociación en el cumplimiento de algunas de las recomendaciones y la realización de la dieta. Sin embargo, no se encontró una asociación entre el EN y el tipo de dieta seguida.

## ANEXO 8

# ALIMENTACIÓN, ESTADO NUTRICIONAL Y MICROBIOTA INTESTINAL EN UN GRUPO DE NIÑOS Y ADOLESCENTES DE URUGUAY

Camila Martínez, Camila Ibañez, Lucía Suster, Marisabel Charlo, Sofía Leal

Tutoras: Asist. Mag. María Paula Mendive<sup>1\*</sup> y Prof. Dra. Marcela Guerendain<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de educación. <sup>2</sup>Área de investigación. Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. \*E-mail: paula.mendive@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La alimentación es uno de los factores modificables más influyentes en el estado nutricional y en la composición de la microbiota intestinal.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar la alimentación de niños y adolescentes y su relación con el estado nutricional y la microbiota intestinal.

## METODOLOGÍA

Estudio descriptivo transversal, tamaño muestral: 30 individuos entre 3 y 12 años. Datos recolectados en enero y febrero de 2020. Mediante diario dietético de 3 días se cuantificó la ingesta de lácteos, frutas y hortalizas, cereales y tubérculos, carnes, bebidas azucaradas y productos dulces industrializados. Se utilizó IMC/edad para estudiar el estado nutricional y KIDMED (mediante diario dietético) para estudiar la adherencia al patrón de Dieta Mediterránea. Se analizaron los valores de diversidad bacteriana, y la abundancia relativa de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium*, obtenida por análisis del gen ARNr 16s.

## RESULTADOS

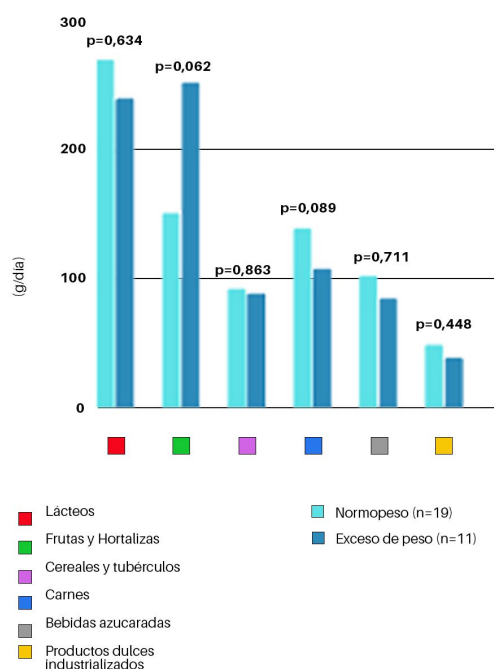
### Características de la población

La media de edad fue  $7,2 \pm 2,6$  años; y un 76,7% eran de sexo masculino. Un 63,3% presentaban normopeso y un 36,7% exceso de peso. La adherencia a la Dieta Mediterránea se distribuyó en baja y media.

### Asociación entre adherencia a la Dieta Mediterránea y estado nutricional (Chi cuadrado)

| Categoría de KIDMED     | Normopeso (n=19) | Exceso de peso (n=11) | Valor p |
|-------------------------|------------------|-----------------------|---------|
| Adherencia pobre (n=16) | 33,3%            | 20,0%                 | 0,919   |
| Adherencia media (n=14) | 30,0%            | 16,7%                 |         |

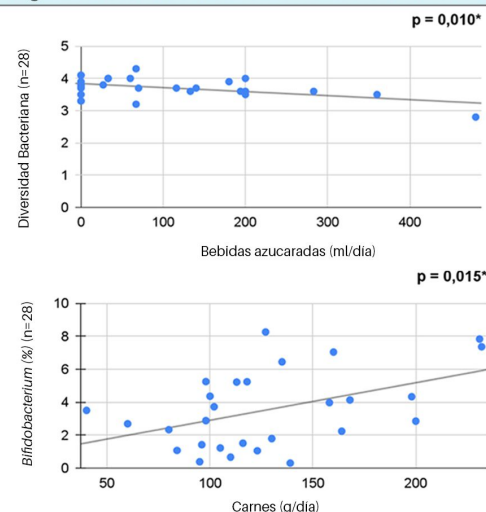
### Ingesta de alimentos según el estado nutricional (t-student)



### Ingesta de alimentos según componentes de la microbiota intestinal (ANOVA y corrección Post Hoc)

| Variables                   | Bebidas azucaradas (ml/día) | Carnes (g/día) |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| <i>Lactobacillus</i> (n=28) | T1                          | 144,0 ± 156,1  |
|                             | T2                          | 107,0 ± 115,4  |
|                             | T3                          | 52,6 ± 71,9    |
|                             | Valor p                     | 0,279          |
|                             |                             | 0,013*         |

### Relación entre microbiota intestinal y cantidad ingerida de alimentos (Correlación lineal de Pearson)



## CONCLUSIONES

Se encontró que la diversidad bacteriana es menor en quienes presentan un mayor consumo de bebidas azucaradas. En relación a la ingesta de carnes, se observó una asociación positiva con el género de bacterias *Bifidobacterium*. Además, en este grupo de alimentos se identificó una diferencia significativa entre los terciles 2 y 3 del género *Lactobacillus*.

## ANEXO 9

# INGESTA DIETÉTICA, ESTADO NUTRICIONAL Y RATIO BACTEROIDETES/FIRMICUTES EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

Argüello Noelia, Bentancor Yessica, Bermudez Carolina, Delgado Germán, Giordano Florencia, Hernández Soledad  
Tutora: Asist. Mg. Paula Mendive <sup>1-2</sup> Tutora: Prof. Dra. Marcela Guerendiain <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Educación; Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup> Área de investigación; Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

\*E-mail: mpmendive@nutricion.edu.uy

## Introducción:

En Uruguay existe un incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes, donde se destaca el consumo excesivo de embutidos, carnes y el bajo consumo de frutas y vegetales. Estudios indican que la interacción entre la microbiota intestinal y la dieta de los niños tiene un efecto tanto en la protección como en el riesgo de obesidad.

## Objetivos:

Evaluar la relación entre la frecuencia del consumo de alimentos, el estado nutricional y el ratio de los filos Bacteroidetes/Firmicutes en niños y adolescentes.

## Metodología:

Se realizó un estudio de tipo transversal descriptivo, en 29 niños y adolescentes entre 3 y 12 años, residentes en Uruguay.

## Resultados:

Características de la población de estudio.

| Variables          | Categorías       | n  | (%)  |
|--------------------|------------------|----|------|
| Sexo               | Femenino         | 6  | 20,7 |
|                    | Masculino        | 23 | 79,3 |
| Edad               | <5 años          | 5  | 17,2 |
|                    | ≥5 años          | 24 | 82,8 |
| Estado nutricional | Emaciado         | 0  | 0,0  |
|                    | Normopeso        | 18 | 62,1 |
|                    | Sobrepeso        | 6  | 20,7 |
|                    | Obesidad         | 5  | 17,2 |
| Clasificación B/F  | ratio adecuado   | 4  | 14,3 |
|                    | ratio inadecuado | 24 | 85,7 |

Frecuencia de consumo de alimentos.

| Alimentos             | Frecuencia de consumo |      |           |      |           |      |
|-----------------------|-----------------------|------|-----------|------|-----------|------|
|                       | 0 a 3 v/m             |      | 1 a 4 v/s |      | 5 a 7 v/s |      |
|                       | n                     | %    | n         | %    | n         | %    |
| Pan integral de molde | 26                    | 89,7 | 1         | 3,4  | 2         | 6,9  |
| Vegetales crudos      | 14                    | 48,3 | 9         | 31,0 | 6         | 20,7 |
| Vegetales cocidos     | 7                     | 24,1 | 15        | 51,7 | 7         | 24,1 |
| Frutas                | 5                     | 17,2 | 9         | 31,0 | 15        | 51,7 |
| Carnes                | 0                     | 0,0  | 27        | 93,0 | 2         | 7,0  |
| Embutidos             | 20                    | 68,9 | 9         | 31,1 | 0         | 0,0  |
| Fiambres              | 7                     | 24,1 | 21        | 72,4 | 1         | 3,4  |
| Pescados              | 23                    | 79,3 | 6         | 20,7 | 0         | 0,0  |
| Refrescos             | 12                    | 41,4 | 14        | 48,3 | 3         | 10,3 |

Frecuencia de consumo de alimentos en relación a la clasificación del ratio Bacteroidetes/Firmicutes.

| Frecuencia de consumo de alimentos |                         | Clasificación B/F  |                      | n  | Total (%) | Valor p |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|----|-----------|---------|
|                                    |                         | ratio adecuado (%) | ratio inadecuado (%) |    |           |         |
| Pan molde Integral                 | 0 a 3 veces al mes      | 10,7               | 7,5                  | 24 | 85,7      | 0,290   |
|                                    | 1 a 4 veces por semana  | 3,6                | 3,6                  | 2  | 7,1       |         |
|                                    | 5 a 7 veces por semana  | 0,0                | 7,1                  | 2  | 7,1       |         |
| Vegetales crudos                   | 0 a 3 veces al mes      | 7,1                | 39,3                 | 13 | 46,4      | 0,944   |
|                                    | 1 a 4 veces por semana  | 3,6                | 28,6                 | 9  | 32,1      |         |
|                                    | 5 a 7 veces por semana  | 3,6                | 17,9                 | 6  | 21,4      |         |
| Vegetales cocidos                  | 0 a 3 veces al mes      | 7,1                | 17,9                 | 7  | 25        | 0,311   |
|                                    | 1 a 4 veces por semana  | 7,1                | 42,9                 | 14 | 50        |         |
|                                    | 5 a 7 veces por semana  | 0,0                | 25                   | 7  | 25        |         |
| Frutas                             | 0 a 3 veces al mes      | 0,0                | 17,9                 | 5  | 17,9      | 0,523   |
|                                    | 1 a 4 veces por semana  | 7,1                | 25,0                 | 9  | 32,1      |         |
|                                    | 5 a 7 veces por semana  | 7,1                | 42,9                 | 14 | 50,0      |         |
| Carnes                             | 1 a 4 veces por semana  | 14,3               | 78,6                 | 26 | 92,9      | 1,000   |
|                                    | 5 a 7 veces por semana  | 0,0                | 7,1                  | 2  | 7,1       |         |
|                                    | 0 a 3 veces al mes      | 10,7               | 80,7                 | 20 | 71,4      |         |
| Embutidos                          | 1 a 4 veces por semana  | 3,6                | 25,0                 | 8  | 28,6      | 1,000   |
|                                    | 0 a 3 veces al mes      | 10,7               | 14,3                 | 7  | 25        |         |
|                                    | 1 a 4 veces por semana  | 3,6                | 71,4                 | 21 | 75        |         |
| Fiambres                           | 0 a 3 veces al mes      | 14,3               | 67,9                 | 23 | 82,1      | 0,038   |
|                                    | 1 a 4 veces por semana  | 0,0                | 17,9                 | 5  | 17,9      |         |
|                                    | 0 a 3 veces al mes      | 7,1                | 35,7                 | 12 | 42,9      |         |
| Refrescos                          | 1 a 7 veces por semana* | 7,1                | 50                   | 16 | 57,1      | 0,011   |

Se obtuvo un valor estadísticamente significativo en las variables clasificación del ratio B/F y la FC de refrescos ( $p=0,011$ ) y la FC de fiambres ( $p=0,038$ ). Se destaca que el 50% consumen refrescos de 1 a 7 v/s y el 71,4% fiambres de 1 a 4 v/s, teniendo ambos un ratio inadecuado.

## Conclusión:

La presente investigación demostró que hay una relación entre la variable FC de fiambres y la FC de refrescos con los filos Bacteroidetes/Firmicutes de la microbiota intestinal. Por otra parte, no se encontró asociación entre el resto de las variables de estudio (frecuencia de consumo de alimentos, clasificación ratio B/F y el estado nutricional en niños y adolescentes).

## ANEXO 10



# CREENCIAS, CONOCIMIENTOS Y FUENTES DE INFORMACIÓN UTILIZADAS POR LOS PADRES SOBRE LA ALIMENTACIÓN DE SUS HIJOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

Paola Berriel, Florencia Clavijo, Agustina Duro, Romina Eguren, Sofía Olivera, Ana Padilla, Carolina Rodríguez  
Tutora: Prof. Asist. MSc. M. Paula Mendive<sup>1\*</sup> Cotutora: Asist. Lic. Nut. Fernanda Lemes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Educación; Nivel Profesional, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>2</sup>Nivel Profesional, Montevideo, Uruguay

\*E-mail: mpmendive@nutricion.edu.uy

## INTRODUCCIÓN

Estudios mencionan que las fuentes de información, creencias y conocimientos de los padres pueden influir en el tipo de dieta que realizan sus hijos con Trastorno del Espectro Autista (TEA), existe controversia en la evidencia científica de que la dieta libre de gluten y caseína (DLGC) favorezca el comportamiento y la sintomatología de sus hijos con TEA.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar las fuentes de información que utilizan los padres, conocimientos sobre dieta libre de gluten y caseína, creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología de sus hijos con TEA.

## METODOLOGÍA

Estudio observacional, transversal, descriptivo, con una población de 34 niños entre 3 y 12 años diagnosticados con TEA en Uruguay. Se recabaron datos mediante un cuestionario online autoadministrado a los padres, del cual se obtuvieron las siguientes variables: tipo de dieta del hijo, conocimientos sobre DLGC, creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología del TEA, fuente de información utilizada y cantidad de fuentes de información. Para conocer si existe relación entre las variables cualitativas se utilizó el test chi-cuadrado. Para comparar la cantidad de fuentes según las categorías de las variables cualitativas se utilizó t-student. Se consideró un nivel de significancia  $p < 0,05$  para todos los resultados obtenidos. Los datos se procesaron en el programa estadístico PSPP (versión 1.2.0.6).

## RESULTADOS

Asociación entre fuente de información utilizada y conocimientos sobre dieta libre de gluten y caseína.

| Fuente de información utilizada (n=31) |    | Conocimientos sobre dieta libre de gluten (n=33) |       |         | Conocimientos sobre dieta libre de caseína (n=33) |       |         |
|----------------------------------------|----|--------------------------------------------------|-------|---------|---------------------------------------------------|-------|---------|
|                                        |    | No                                               | Si    | Valor p | No                                                | Si    | Valor p |
| Familiares y amigos                    | No | 16,13                                            | 6,45  | 0,67    | 0,00                                              | 22,58 | 0,29    |
|                                        | Si | 45,16                                            | 32,26 |         | 19,35                                             | 58,06 |         |
| Medios científicos                     | No | 3,23                                             | 9,68  | 1,00    | 9,68                                              | 3,23  | 0,01    |
|                                        | Si | 35,48                                            | 51,61 |         | 9,68                                              | 77,42 |         |
| Internet                               | No | 22,58                                            | 12,90 | 1,00    | 6,45                                              | 29,03 | 1,00    |
|                                        | Si | 38,71                                            | 25,81 |         | 12,90                                             | 51,61 |         |

Resultados expresados en porcentajes. (Prueba exacta de Fisher para tablas 2x2, con valores esperados menores a 5).

Asociación entre tipo de dieta del hijo con creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología del Trastorno del Espectro Autista.

| Variable                                                                                             |          | Tipo de dieta del hijo (n=34) |          | Valor p |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------|----------|---------|
|                                                                                                      |          | Sin DLGC                      | Con DLGC |         |
| Creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología del TEA (Clasificación uno) (n=28) | No       | 3,57                          | 3,57     | 0,54    |
|                                                                                                      | Sí       | 28,57                         | 64,29    |         |
| Creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología del TEA (Clasificación dos) (n=34) | No/No sé | 20,59                         | 2,94     | 0,01    |
|                                                                                                      | Sí       | 23,53                         | 52,94    |         |

Resultados expresados en porcentajes. (Prueba exacta de Fisher para tablas 2x2, con valores esperados menores a 5). TEA: Trastorno del Espectro Autista. DLGC: dieta libre de gluten y caseína.

Comparación entre la cantidad de fuentes de información utilizadas según tipo de dieta del hijo, conocimientos sobre dieta libre de gluten y caseína y creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología del Trastorno del Espectro Autista.

| Variable                                                                                             |          | Cantidad de fuentes de información utilizadas (n=31) | Valor p |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|------------------------------------------------------|---------|
| Tipo de dieta del hijo (n=34)                                                                        | Sin DLGC | 3,67 ± 1,37                                          | 0,31    |
|                                                                                                      | Con DLGC | 3,11 ± 1,56                                          |         |
| Conocimientos sobre dieta libre de gluten (n=33)                                                     | No       | 3,11 ± 1,45                                          | 0,31    |
|                                                                                                      | Si       | 3,67 ± 1,56                                          |         |
| Conocimientos sobre dieta libre de caseína (n=33)                                                    | No       | 3,17 ± 1,17                                          | 0,78    |
|                                                                                                      | Si       | 3,36 ± 1,58                                          |         |
| Creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología del TEA (Clasificación uno) (n=28) | No       | 3,50 ± 0,71                                          | 0,87    |
|                                                                                                      | Sí       | 3,32 ± 1,63                                          |         |
| Creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología del TEA (Clasificación dos) (n=34) | No/No sé | 3,33 ± 0,82                                          | 0,98    |
|                                                                                                      | Sí       | 3,32 ± 1,63                                          |         |

Resultados expresados media ± desviación estándar (prueba t). DLGC: dieta libre de gluten y caseína. TEA: Trastorno del Espectro del Autista.

No hubo diferencia estadísticamente significativa para la Asociación entre tipo de dieta del hijo con conocimientos sobre dieta libre de gluten y caseína y la fuente de información utilizada.

## CONCLUSIONES

Estos hallazgos muestran que existe una relación estadísticamente significativa entre la clasificación dos de creencias sobre el efecto de la alimentación en la sintomatología del TEA y tipo de dieta del hijo, así como también en medios científicos como fuente de información que utilizan los padres y conocimientos sobre DLG.

## ANEXO 11

Gonzalo Ortiz, Florencia Rivas, Eloísa Rodríguez, Karina Rodríguez  
Tutoras: Asist. Mag. M. Paula Mendive<sup>1\*</sup> Prof. Adj. Dra. Marcela Guerendain<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto de Educación; <sup>2</sup>Área de Investigación

Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. \*Email: mpmendive@nutricion.edu.uy

## INTRODUCCIÓN

Los síntomas gastrointestinales (SGI) son una causa frecuente de consulta pediátrica, manifestándose mayoritariamente en las personas con trastorno del espectro autista (TEA) respecto a los neurotípicos (NT), siendo, el estado nutricional, patrones dietéticos y factores perinatales posibles factores influyentes en su desarrollo.

## OBJETIVO

Analizar la sintomatología gastrointestinal en función del estado nutricional y tipo de parto en niños y adolescentes con trastorno del espectro autista y neurotípicos.

## METODOLOGÍA

Estudio transversal en niños y adolescentes de 3 a 12 años de edad, con TEA (n=35) y NT (n=30) residentes en Uruguay, participantes del proyecto “Alimentación, nutrición y salud intestinal en niños y adolescentes con trastorno del espectro autista y neurotípicos”. Se recabaron datos sobre SGI, exclusión de alimentos con gluten y caseína, tipo de parto y datos antropométricos. Los SGI fueron evaluados mediante un cuestionario de índice de severidad gastrointestinal (ISG), agrupando el puntaje total en terciles. El puntaje Z del IMC/E se clasificó en normopeso ( $Z \geq -2$  DE y  $< +1$  DE) y malnutrición por exceso ( $Z \geq +1$  DE). Se estudió: tipo de parto (cesárea/vaginal) y la realización de una dieta libre de gluten y caseína (dieta si/dieta no) en el grupo con TEA.

## RESULTADOS

No hubo diferencias significativas en el puntaje Z del IMC/Edad entre los participantes con TEA y NT. Los SGI manifestados respecto al grado de severidad ( $\geq 4$ ), en dichos participantes (TEA y NT) fueron, olor en las heces anormal (12,3%), irritabilidad (24,6%), despertar nocturno (21,5%). El puntaje de ISG fue mayor en TEA con malnutrición por exceso ( $4,0 \pm 2,1$  puntos) en comparación a los NT ( $1,8 \pm 1,8$  puntos) con igual estado nutricional, así como en los niños y adolescentes con TEA nacidos por cesárea ( $3,8 \pm 2,1$  puntos) respecto a los NT ( $2,0 \pm 1,9$  puntos) nacidos por cesárea. En el grupo con TEA no hubo relación entre la SGI y el tipo de dieta realizada.

Relación entre la sintomatología gastrointestinal de los niños y adolescentes con TEA y NT y puntaje total del Índice de Severidad Gastrointestinal

| Sintomatología Gastrointestinal (%) | Puntaje total del ISG |            |                 | Valor p |
|-------------------------------------|-----------------------|------------|-----------------|---------|
|                                     | T1 ( $\leq 1$ )       | T2 (2 – 3) | T3 ( $\geq 4$ ) |         |
| <b>Constipación *</b>               |                       |            |                 |         |
| 5 o más deposiciones/semana         | 23,8                  | 15,9       | 17,5            | 0,221   |
| 3 a 4 deposiciones/semana           | 9,5                   | 19,0       | 14,3            |         |
| <b>Diarrea</b>                      |                       |            |                 |         |
| 0 a 1 deposiciones blandas/semana   | 32,3                  | 33,8       | 21,5            | -       |
| 2 a 3 deposiciones blandas/semana   | 0                     | 0          | 12,3            |         |
| <b>Consistencia promedio heces</b>  |                       |            |                 |         |
| Formada                             | 32,3                  | 29,2       | 21,5            | -       |
| Sin forma                           | 0                     | 4,6        | 12,3            |         |
| <b>Olor en heces</b>                |                       |            |                 |         |
| Normal                              | 30,8                  | 27,7       | 21,5            | 0,033   |
| Anormal                             | 1,5                   | 6,2        | 12,3            |         |
| <b>Flatulencias</b>                 |                       |            |                 |         |
| Normal                              | 29,2                  | 27,7       | 20,0            | 0,059   |
| Frecuente                           | 3,1                   | 6,2        | 13,8            |         |
| <b>Dolor abdominal</b>              |                       |            |                 |         |
| No                                  | 32,3                  | 27,7       | 18,5            | -       |
| Si                                  | 0                     | 6,2        | 15,4            |         |
| <b>Irritabilidad</b>                |                       |            |                 |         |
| No                                  | 30,8                  | 21,5       | 9,2             | 0,001   |
| Si                                  | 1,5                   | 12,3       | 24,6            |         |
| <b>Despertar nocturno</b>           |                       |            |                 |         |
| No                                  | 30,8                  | 20,0       | 12,3            | 0,001   |
| Si                                  | 1,5                   | 13,8       | 21,5            |         |
| <b>Dolor abdominal hoy</b>          |                       |            |                 |         |
| No                                  | 32,3                  | 33,8       | 29,2            | -       |
| Si                                  | 0                     | 0          | 4,6             |         |

Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$  (chi-cuadrado para valores esperados mayores o iguales a 5 y prueba exacta de Fisher para tablas de 2x2, con valores esperados menores a 5). \* Para la variable constipación  $n = 63$ . T1, T2 y T3: terciles 1, 2, 3 respectivamente. TEA: trastorno del espectro autista, NT: neurotípicos, ISG: índice de severidad gastrointestinal.

Puntaje total del Índice de Severidad Gastrointestinal según estado nutricional y tipo de parto de los niños y adolescentes con TEA y NT

| Variables               |           | Puntaje total del ISG |           |           |    |            | Comparación de medias del puntaje total del ISG entre TEA y NT |
|-------------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------|----|------------|----------------------------------------------------------------|
| Estado Nutricional      | TEA       | n                     | Valor p * | NT        | n  | Valor p ** | Valor p                                                        |
| Normopeso               | 3,0 ± 2,0 | 19                    | 0,179     | 2,3 ± 2,0 | 19 | 0,550      | 0,270                                                          |
| Malnutrición por exceso | 4,0 ± 2,1 | 14                    |           | 1,8 ± 1,8 | 11 |            | 0,012                                                          |
| Tipo de parto           |           |                       |           |           |    |            |                                                                |
| Cesárea                 | 3,8 ± 2,1 | 22                    | 0,378 *** | 2,0 ± 1,9 | 22 | 0,644 **** | 0,004                                                          |
| Vaginal                 | 3,2 ± 2,2 | 13                    |           | 2,4 ± 2,1 | 8  |            | 0,435                                                          |

Resultados expresados en medias  $\pm$  desviación estándar. Valor p\* = a la comparación del puntaje total del ISG según el estado nutricional del grupo con TEA. Valor p\*\* = a la comparación del puntaje total del ISG según el estado nutricional del grupo NT. Valor p\*\*\* = a la comparación del puntaje total del ISG según el tipo de parto del grupo con TEA. Valor p\*\*\*\* = a la comparación del puntaje total del ISG según el tipo de parto del grupo NT. Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$  (prueba t). TEA: trastorno del espectro autista, NT: neurotípicos, ISG: índice de severidad gastrointestinal.

## CONCLUSIONES

Al comparar la severidad de los síntomas gastrointestinales de los niños con TEA y NT se observó:

Los niños y adolescentes con TEA que presentaron malnutrición por exceso manifestaron un ISG mayor que sus pares NT con el mismo estado nutricional. Los participantes con TEA nacidos por cesárea, presentaron un ISG mayor respecto a sus pares NT, nacidos por el mismo tipo de parto