Disbiosis intestinal y su asociación con niveles de calprotectina y zonulina fecal en niños con trastornos del espectro autista

María Fátima Garcés, Jefferson Guzmán, Xiomara Moreno, Ana Cecilia Márquez, Karolina López, Yacelli Bustamante

Afiliación

Autor de Correspondencia: María Fátima Garcés Correo Electrónico: mariafatimagarcesdasilva@gmail.com

Resumen

Introducción: La disbiosis en niños con trastornos del espectro autista (TEA), puede inducir inflamación intestinal y alteraciones en la permeabilidad intestinal favoreciendo la presencia de manifestaciones gastrointestinales y neuroconductuales. **Objetivo:** Evaluar la relación que existe entre la disbiosis y los niveles fecales de zonulina y calprotectina en niños con TEA. **Métodos:** Los niveles de zonulina fueron evaluados mediante la técnica de inmunoensayo enzimático ligado a enzima (ELISA), calprotectina fecal por Turbidimetria y la disbiosis por el método de cultivo, en una cohorte de 40 niños con TEA y 18 niños normotípicos. **Resultados:** El 95% de los pacientes con TEA estudiados presentaron disbiosis intestinal. Un 65 % de los pacientes con disbiosis tenían niveles elevados de zonulina y/o calprotectina fecal. Se encontraron niveles elevados de zonulina fecal en 15% de los pacientes con TEA obteniendo un valor mediano de 44,5 (IQR=43,0) ng/mL en el grupo TEA y de 42,0 (IQR=19,0) ng/mL en el grupo control, sin diferencias significativas entre los dos grupos. Se encontraron niveles elevados de calprotectina fecal en el 60 % de los pacientes con TEA, obteniendo un valor mediano de 75,0 (IQR= 127,3) µg/g y en el grupo control de 21,0 (IQR=23,5) µg/g, siendo significativamente mayor la distribución de calprotectina en los pacientes con TEA que en el grupo control (W = 116,5, p<0,001). **Conclusión:** Se observó una relación entre la disbiosis, los síntomas gastrointestinales y los niveles elevados de calprotectina fecal en pacientes con TEA.

Palabras clave: Trastorno del Espectro Autista, Zonulina, Calprotectina, Inflamación intestinal crónica, permeabilidad intestinal.

Intestinal dysbiosis and its association with fecal calprotectin and zonulin levels in children with autism spectrum disorders

Abstract

Introduction: Dysbiosis in children with autism spectrum disorders (ASD) can lead to intestinal inflammation and increased intestinal permeability, which may contribute to gastrointestinal and neurobehavioral manifestations. **Objective:** To assess the relationship between dysbiosis and fecal levels of zonulin and calprotectin in children with ASD. **Methods:** Zonulin levels were measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique, fecal calprotectin levels via turbidimetry, and dysbiosis was assessed through culture methods in a cohort of 40 children with ASD and 18 neurotypical children. **Results:** Intestinal dysbiosis was identified in 95% of the ASD patients studied. Among these, 65% exhibited elevated levels of zonulin and/or fecal calprotectin. High levels of fecal zonulin were observed in 15% of children with ASD, with a median value of 44.5 ng/mL (IQR = 43.0) in the ASD group and 42.0 ng/mL (IQR = 19.0) in the control group, with no significant differences between groups. Elevated fecal calprotectin levels were found in 60% of children with ASD, with a median value of 75.0 µg/g (IQR = 127.3), compared to 21.0 µg/g (IQR = 23.5) in the control group. Calprotectin levels were significantly higher in the ASD group compared to controls (W = 116.5, p < 0.001). **Conclusion:** A relationship was observed between dysbiosis, gastrointestinal symptoms, and elevated fecal calprotectin levels in children with ASD.

Keywords: Autism Spectrum Disorder, Zonulin, Calprotectin, Chronic intestinal inflammation, intestinal permeability.

Introducción

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un grupo heterogéneo de trastornos del neurodesarrollo cuyas características claves de comportamiento están definidas por la presencia de dificultades en la reciprocidad social y de comunicación junto a intereses usualmente estrechos, lenguaje y comportamientos repetitivos, y una respuesta sensorial alterada, que aparecen antes de los 3 años de edad.[1,2]

Se han descrito diversos factores etiológicos que se asocian al desarrollo del espectro Autista entre ellos: genéticos, ambientales, neurológicos e inmunológicos,[3] así como el aumento de los mediadores inflamatorios.[4] Sin embargo, el eje intestino-cerebro es un campo emergente de investigación en los TEA y se ha reportado una prevalencia de síntomas gastrointestinales (GI) en un rango desde 9 % al 91 % atribuido al incremento de la permeabilidad intestinal, inflamación intestinal, cambios en la composición microbiana (disbiosis) y reacciones alérgicas.[5]

Los síntomas gastrointestinales y la barrera intestinal alterada son más comunes en personas con autismo, encontrándose mayor prevalencia en niños con TEA en comparación con grupos de niños controles,[6] con una fuerte correlación positiva entre los problemas intestinales y la gravedad del TEA.[7] Se pueden utilizar algunos procedimientos para detectar inflamación intestinal, como

Cómo citar este artículo: Garcés MF, Guzmán J, Moreno X, Márquez AC, López K, Bustamante Y. Disbiosis intestinal y su asociación con niveles de calprotectina y zonulina fecal en niños con trastornos del espectro autista. Rev Gen. 2025;79(1):29-37. doi: 10.61155/gen.v79i1.729

endoscopia, biopsia, colonoscopia y análisis de marcadores bioquímicos en las heces como la calprotectina y zonulina.[8]

La calprotectina es una proteína citoplasmática que está presente principalmente en los neutrófilos; se libera por muerte y alteración celular.[9] Durante algunos procesos inflamatorios, la calprotectina se libera en grandes cantidades con los exudados intracelulares y se puede encontrar en los fluidos corporales y el suero; por lo tanto, puede considerarse un marcador útil de inflamación.[10] La presencia de calprotectina en las heces o fecal (CF), indica migración de neutrófilos e infiltración en el tracto intestinal, correlacionándose muy bien con la inflamación macroscópica e histológica.[11]

La CF es un excelente marcador para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), debido a su alta sensibilidad y especificidad (89% y 81% respectivamente) en adultos y niños se utiliza de forma rutinaria como marcador no invasivo.[12]

Entre las células del epitelio intestinal se encuentran las uniones estrechas intercelulares o *Tight Junction* (*TJ*) que son las encargadas de regular el paso intracelular de las macromoléculas. La zonulina es la proteína endógena que actúa como modulador fisiológico de las *TJ*. Esta proteína, mediante su anclaje a receptores específicos de la membrana, activa una cascada de señales que dan como resultado una pérdida en la organización de las *TJ*. Esta desestructuración lleva al aumento de la permeabilidad de la de vía paracelular. Es un proceso reversible, ya que cuando los niveles de zonulina dejan de señalizar, las *TJ* vuelven a su estructura inicial.[13-15]

En cuanto a los factores involucrados que pueden aumentar esta proteína destacan la disbiosis (alteración de la microbiota intestinal), por la liberación de enterotoxinas que pueden generar ciertos patógenos y el gluten. Otros factores incluyen los tóxicos como el alcohol y algunos medicamentos.[14,16,17]

El objetivo del presente estudio fue evaluar las concentraciones de calprotectina y zonulina fecal como marcadores de inflamación y permeabilidad gastrointestinal con la disbiosis intestinal en niños dentro del espectro autista.

Método

Tipo y nivel de la investigación

El presente trabajo es un estudio descriptivo-correlacional, transversal no experimental, realizado en un grupo de niños diagnosticados con TEA y un grupo control.

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (U.C.V), en colaboración con la Unidad de Autismo “Negra Matea”, adscrito a la Maternidad Concepción Palacios, el departamento de Microbiología del Instituto Médico la Floresta y la Unidad de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica Hospital General “Dr. Miguel Pérez Carreño”. El protocolo del estudio se realizó bajo las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para trabajos de investigación en humanos y la Declaración Helsinki de 1975, bajo la última revisión realizada el 5 de mayo de 2015.[18] Adicionalmente, esta investigación contó con el aval del comité de Bioética de la Escuela de Bioanálisis y el consentimiento informado de los padres y/o representantes de los niños del estudio.

Población de estudio

La población estuvo constituida por 40 niños y adolescentes con edades comprendidas entre los 3 a 17 años, atendidos entre mayo 2023 – junio 2024 en la unidad de Autismo del edificio “Negra Matea” de la Maternidad Concepción Palacios, y como grupo control, 18 niños aparentemente sanos con edades comprendidas entre los 3 y 17 años de edad, que asistieron al Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis-UCV. Todos los niños estudiados fueron sometidos a una minuciosa anamnesis y exploración física completa con especial énfasis en la exploración neurológica.

Criterios de inclusión TEA: niños y adolescentes atendidos en el servicio de neuropediatría de la unidad de Autismo de la Maternidad concepción Palacios con criterios incluidos en el manual de diagnóstico y estadística de los trastornos mentales DSM-V[19] y la escala de observación para el diagnóstico del autismo (ADOS).[20] No haber utilizado ningún tipo de antimicrobianos, antifúngicos o antiparasitarios, y que no hayan recibido tratamiento antiinflamatorio como AINE y esteroides en los últimos seis meses anteriores, al día de la colecta de las muestras.

Criterios de inclusión grupo control: niños sin trastornos del neurodesarrollo, enfermedades de base o disfuncionalidad del sistema inmunológico. No haber utilizado ningún tipo de antimicrobianos, antifúngicos o antiparasitarios, y que no hayan recibido tratamiento antiinflamatorio como es el caso de AINE y esteroides en los últimos seis meses anteriores, al día de la colecta de las muestras.

A los niños con TEA se les realizó una encuesta con una escala de calificación de síntomas gastrointestinales (GSRS) con la ayuda de los padres.[21] El grupo de control no recibió este cuestionario ya que fue seleccionado entre pacientes que no tenían ningún problema de SIG. El cuestionario constaba de un total de 15 síntomas, cada uno con una subescala separada. Cada pregunta fue evaluada entre cero y tres puntos. Para los síntomas que se consideraron normales, se otorgaron cero puntos, y para los síntomas que se desvían del promedio, se otorgaron tres

© Revista Gen. Caracas, Venezuela - ISSN 2477-975X

https://doi.org/10.61155/gen.v79i1.729

puntos. La puntuación más baja alcanzada fue cero y la puntuación máxima fue de 27 puntos en el cuestionario, tomandose en cuenta sintomas de tracto digestivo inferior (TGI) (intestinos delgado y grueso). [21]

Las muestras de las deposiciones fueron tomadas por los padres de acuerdo a un instructivo suministrado para la recolección, preservación y traslado. Para el procesamiento de las muestras en el laboratorio de microbiología y la interpretación del grado de disbiosis se utilizó la metodología estandarizada por Moreno *et al*., que clasifica la disbiosis en Grado I, Grado II, Grado III y Ausente.[22] Esta investigación se basó en la identificación y evaluación de la MI transitoria aeróbica como causante de disbiosis. En cuanto a los niveles de Calprotectina fecal (CF) se determinaron por Turbidimetria (CerTest Biotec, España) y la zonulina fecal (ZF) mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) en sándwich utilizando el kit ELISA de zonulina humana (IDK, Alemania). Las muestras de heces para el análisis de estos biomarcadores se almacenaron a una temperatura de -80 °C hasta su procesamiento.

Análisis estadístico

Los datos de la investigación fueron evaluados utilizando R Studio.[23] Se presentaron estadísticas descriptivas para variables cuantitativas, incluyendo la media ± desviación estándar y la mediana con su intervalo intercuartílico (IQR).

Para las variables cualitativas, se utilizaron frecuencias absolutas y relativas. La mediana se empleó para describir las muestras que no seguían una distribución normal. La normalidad de las distribuciones se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Para la comparación de grupos independientes, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos y la prueba T de Student para datos paramétricos. Para explorar la relación entre variables continuas, se realizó una correlación de Spearman, adecuada para datos no paramétricos, junto con el cálculo del p-valor para determinar la significancia estadística de las asociaciones.

Las asociaciones entre variables cualitativas fueron analizadas utilizando la prueba de Chi-cuadrado. En casos con frecuencias esperadas menores a cinco, se empleó la prueba exacta de Fisher para evaluar la independencia entre categorías. El nivel de significancia estadística se fijó en $p < 0.05$ para todas las pruebas realizadas.

Resultados

El total de pacientes en el grupo con TEA fue de n=40, con una edad media de 7,0±4,6 años (rango 7-17 años), de estos: siete (17,5%) son del género femenino y 33 (82.5%) del género masculino; mientras que en el grupo control, 18 individuos con edad media de 13,8±2,6 años (rango 7-17 años), 8 (44,4%) correspondían al género femenino y 10 (55,6%) al género masculino (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características de los pacientes y grupo control

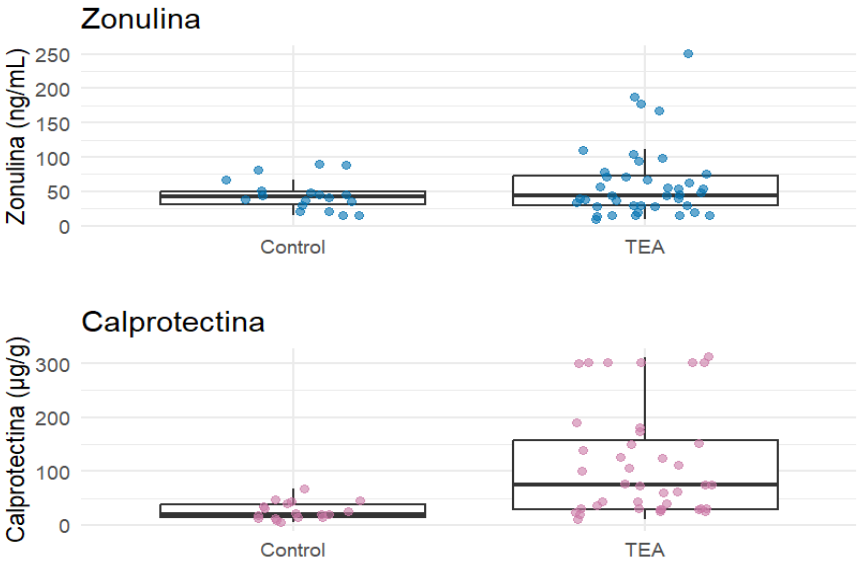
	Control (n=17)		TEA (n=40)	
	Media ± DE	Mediana (IQR)	Media ± DE	Mediana (IQR)
Edad (años)	13,9 ± 2,59	13,9 (3,8)	7 ± 4,6	5,0 (7,0)
Zonulina (ng/mL)	45,2 ± 23,3	42,0 (19,0)	62,1 ± 53,1	44,5 (43,0)
Calprotectina (µg/g)	27,1 ± 16,6	21,0 (23,5)	114,4 ± 100,3	75,0 (127,3)

Nota: W = 323, p-value = 0.5393

Las distribuciones de los niveles de zonulina y calprotectina en los pacientes con TEA no presentan distribuciones normales (p<0,001). El valor mediano de zonulina fue de 44,5 (IQR=43,0) ng/mL en el grupo de estudio y de 42,0 (IQR=19,0) ng/mL en el grupo control. Los niveles fecales de zonulina no presentaron diferencias significativas entre los grupos (W =323, p = 0.539, Prueba U de Mann-Whitney).

En el caso de la calprotectina el valor mediano en los pacientes fue de 75,0 (IQR= 127,3) µg/g, y en el grupo control de 21,0 (IQR=23,5) µg/g, siendo significativamente mayor la distribución de calprotectina en los pacientes con TEA que en el grupo control (W = 116,5, p<0,001) (**Figura 1**).

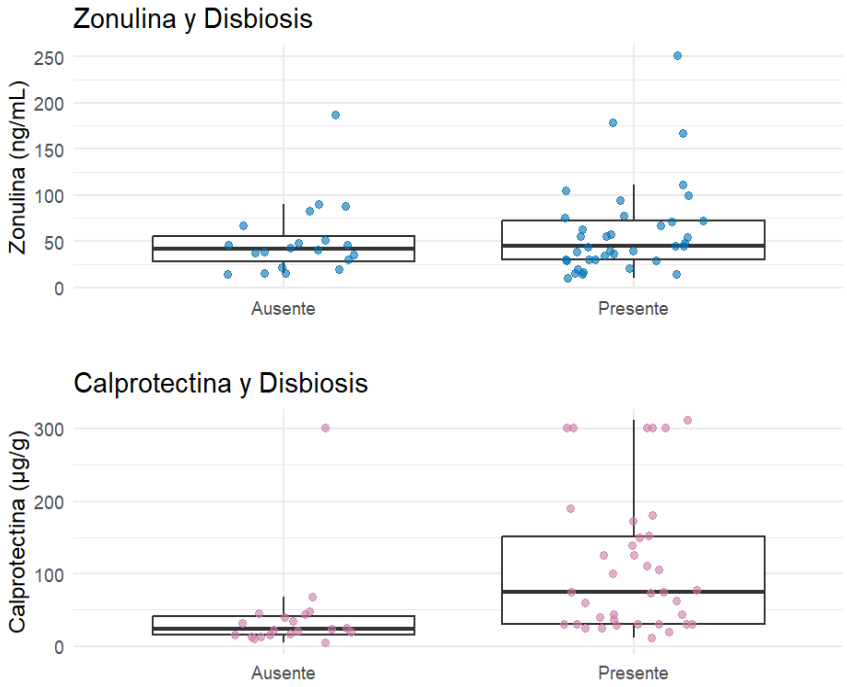
Figura 1. Distribuciones de Zonulina y Calprotectina en pacientes con TEA y grupo control



De los pacientes con TEA, 38 (95%) presentaron disbiosis, mientras que en el grupo control ninguno presentó disbiosis. La zonulina y calprotectina no siguen distribuciones normales (p<0,001). En los pacientes con TEA y disbiosis, el valor mediano de zonulina fue de 44,5 (IQR=41,8) ng/mL, sin diferencias significativas (W=346, p=0,583) con respecto a la mediana de zonulina (42,0 (IQR=27,3) ng/mL) del resto de individuos (n=20).

Por el contrario, los valores medianos de calprotectina (75,0 (IQR=121,5) µg/g) de los pacientes TEA con disbiosis resultaron ser significativamente mayores (W=145, p<0,001) al compararlos con aquellos sin disbiosis (23,0 (IQR=26,0) µg/g) (**Figura 2**).

Figura 2. Distribución de Zonulina y Calprotectina según disbiosis presente en los pacientes



De los pacientes con TEA, 35 (87,5%) presentaron predominantemente disbiosis Grado III, dos (5%) con Grado II, uno (2,5%) con Grado I y solo dos (5%) pacientes no presentaron disbiosis (**Figura 3**).

Al analizar la correlación entre GSRS y los niveles de zonulina se obtiene una baja correlación significativa (rho=0,35, p=0,033), mientras que existe una correlación moderada entre GSRS y Calprotectina (rho=0,41, p=0,009) (**Figura 4**).

Figura 3. Distribución del grado de Disbiosis

.

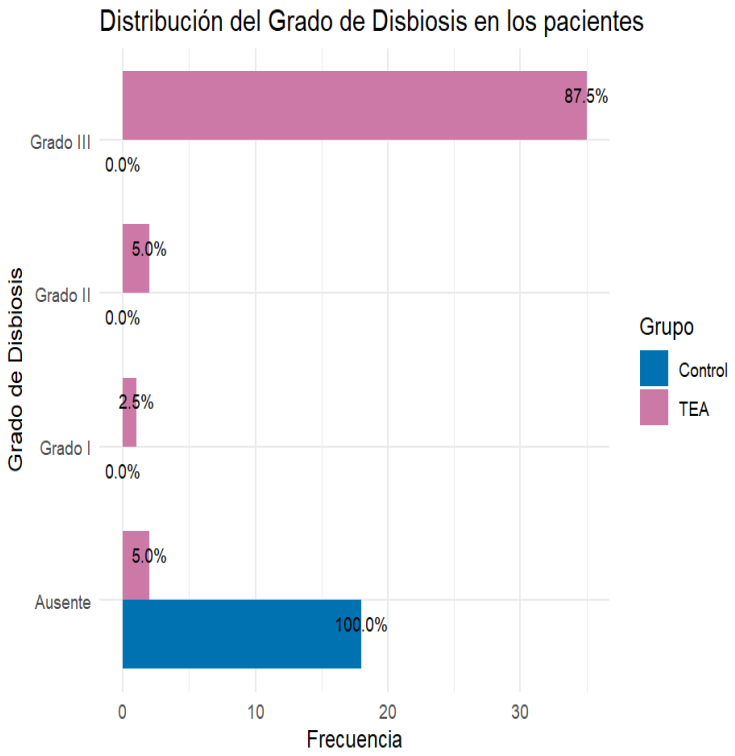
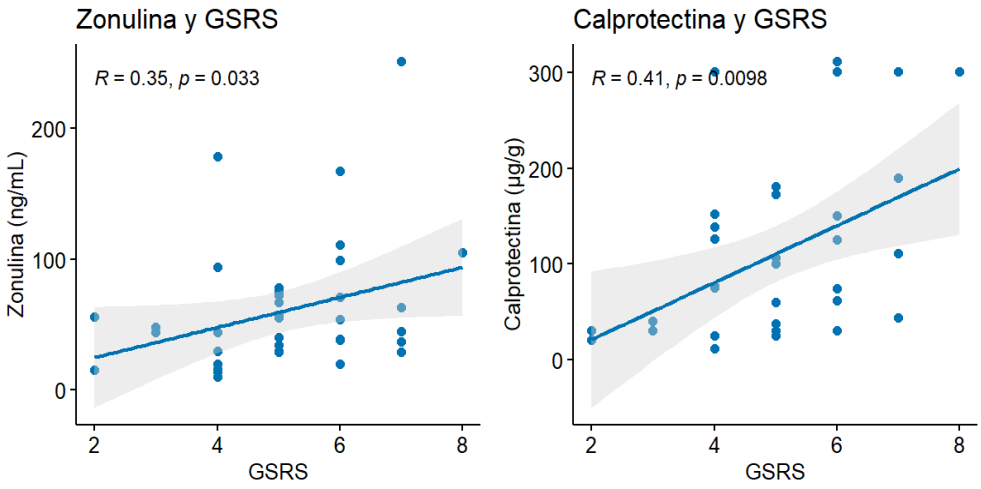
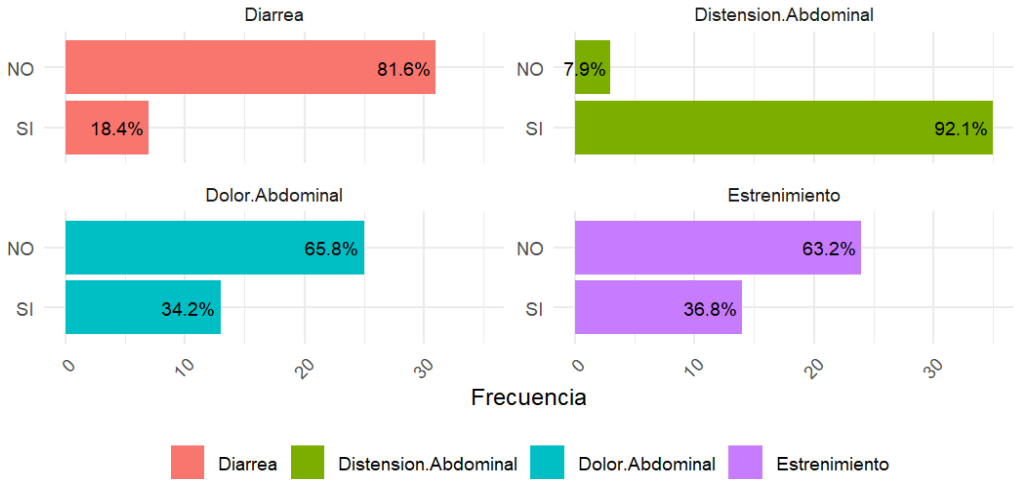


Figura 4. Distribución del grado de Disbiosis



No se encontró asociación entre valores altos de zonulina y disbiosis (p=0,404), o síntomas como estreñimiento (p=0,117), dolor abdominal (p=0,694) o diarrea (p=1,000) (**Figura 5**).

Figura 5. Manifestaciones gastrointestinales en los pacientes



Discusión

La influencia que ejerce la microbiota intestinal (MI) en el funcionamiento intestinal y como causante de inflamación e irritación de su epitelio ha sido demostrada en diferentes estudios [24-26]. La alteración de la microbiota transitoria tiene varias causas, una de las cuales está vinculada con la alimentación, la edad y la genética del individuo; por ello, se continúan investigando las modificaciones que pueden producir la variación de la dieta sobre la MI.[25,27]

Las alteraciones gastrointestinales se han asociado con el autismo, involucrando modificaciones en la composición del microbioma, inflamación y aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal, favoreciendo la hipótesis de que la disbiosis influye en la comunicación microbiota-intestino-cerebro.[28]

En nuestro estudio se encontró que todos los pacientes TEA presentaron algún síntoma gastrointestinal, siendo el más común la distención abdominal (92,1 %), seguido del estreñimiento (36,8 %), dolor abdominal (34,2 %) y diarrea (18,4 %). Coury *et al*. reportaron que la frecuencia de dolor abdominal, estreñimiento y diarrea varía entre 2 % y 41 %; 6 % y 45 %; y 3 % y 77 %, respectivamente.[29] Por su parte, Horvath *et al*., reporta que el 84,1 % de los 412 pacientes con TEA tenían al menos un síntoma gastrointestinal y la mayoría reportó problemas para defecar.[30] Lovene *et al.*, informaron que, en 33 pacientes con TEA, el 50 % presentaba estreñimiento y un 40 % tenían hábitos intestinales variables.[31]

La existencia de una comunicación intestino-cerebro plantea la posibilidad de que el deterioro de la función de la barrera intestinal también pueda participar en la fisiopatología de los Trastornos del Espectro Autista.[32] Varios estudios clínicos han reportado una mayor permeabilidad intestinal en pacientes con TEA en comparación con controles sanos, pero por otro lado hay un grupo sustancial de estudios que no encontraron tales diferencias.[33]

En nuestro estudio se midieron los niveles de dos proteínas en materia fecal, tal es el caso de calprotectina y zonulina, como marcadores de inflamación y permeabilidad intestinal respectivamente. Se encontró que el 60 % de los pacientes TEA presentaron niveles elevados de calprotectina con respecto al grupo control obteniendo un valor límite mínimo de 30 µg/g y un valor muy alto mayor de 300 µg/g, obteniéndose un valor mediano en los TEA de 75,0 (IQR= 127,3) µg/g; el 40% de los individuos estaban por debajo de 50 µg/g, considerándose estos valores dentro de los límites normales. Existe una correlación con el puntaje de la escala GSRS, lo que posiblemente confirma que la inflamación intestinal también podría inducir el malestar gastrointestinal y comportamiento de los pacientes con TEA. Algunos estudios han abordado los niveles de CF en el TEA, como es el estudio realizado por De Magistris *et al.*, quienes encontraron un valor medio patológico alto de FC en individuos con TEA, lo que indica un grado leve de inflamación intestinal.[34]

Con respecto a la zonulina se encontraron niveles elevados de zonulina fecal en 15 % de los pacientes con TEA obteniendo un valor mediano de 44,5 (IQR=43,0) ng/mL en el grupo TEA y de 42,0 (IQR=19,0) ng/mL en el grupo control, más no observándose diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, se observó correlación con los síntomas gastrointestinales, pero no se observó asociación con la disbiosis. Mientras que Esnafoglu *et al*., encontraron niveles aumentados de zonulina en suero de pacientes TEA con respecto al grupo control.[35] La activación de la secreción de zonulina puede ser inducida por diferentes factores, como bacterias entéricas o péptidos de gliadina, que generan un desmontaje de las uniones estrechas y un posterior aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal, lo que permite el paso de sustancias externas, incluidas las proteínas alimentarias, que a su vez activaban las reacciones inmunitarias.[36] En las alteraciones de la barrera intestinal, el contenido de productos que se encuentran en la luz intestinal atraviesan la capa mucosa para afectar los ganglios entéricos e ingresa a la circulación sistémica para afectar el sistema nervioso central. Las macromoléculas microbianas y de origen alimentario, las toxinas, los metales pesados y los compuestos similares a las exorfinas en la luz intestinal atraviesan esta barrera. Además, se liberan neurotransmisores de origen intestinal, citocinas inflamatorias y algunos mediadores. Los compuestos similares a las exorfinas son responsables de la inducción y desarrollo de algunos síntomas autistas.[37]

Conclusiones

Todos los pacientes TEA presentaron alteraciones gastrointestinales y el 95 % exhibieron disbiosis intestinal, presentándose como posibles factores agravantes de la severidad de los trastornos del espectro autista, además, el 60 % de los pacientes TEA presentaron niveles de calprotectina elevadas como marcador de respuesta inflamatoria inespecífica de la mucosa intestinal.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Fuente de financiamiento

Esta investigación no contó con apoyo financiero de ninguna entidad pública, comercial o sin fines de lucro.

Este es un artículo de acceso abierto.

Fecha de recepción: 07/10/2024
Fecha de revisión: 02/11/2024
Fecha de aprobación: 19/11/2024

Referencias

1. Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. Psychol Med. 2015;45(3):601–13. doi: 10.1017/S003329171400172X

2. Oviedo N, Manuel L, Chesnaye E, Guerra C. Aspectos genéticos y neuroendocrinos en el trastorno del espectro autista. Bol Med Hosp Infant Mex. 2015;72(1):5–14.

3. Neuhaus E, Beauchaine TP, Bernier R. Neurobiological correlates of social functioning in autism. Clin Psychol Rev. 2010;30(6):733–48. doi: 10.1016/j.cpr.2010.05.007

4. Vogel A, Laufer BI, Dunaway KW, Hwang H, Mordaunt CE, Coulson RL, et al. Epigenomic convergence of genetic and immune risk factors in autism brain. bioRxiv. 2018;1:1–53. doi: 10.1101/270827

5. McElhanon BO, McCracken C, Karpen S, Sharp WG. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. Pediatrics. 2014;133(5):872–83. doi: 10.1542/peds.2013-3995

6. McElhanon BO, McCracken C, Karpen S, Sharp WG. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. Pediatrics. 2014;133(5):872–83. doi: 10.1542/peds.2013-3995

7. 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(1):22. doi: 10.1186/1471-230X-11-22

8. Kushak RI, Buie TM, Murray KF, et al. Evaluation of intestinal function in children with autism and gastrointestinal symptoms. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2016;62(5):687–91. doi: 10.1097/MPG.0000000000001174

9. Sidler MA, Leach ST, Day AS. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. Inflamm Bowel Dis. 2008;14(3):359–66. doi: 10.1002/ibd.20336

10. Sipponen T, Kolho KL. Fecal calprotectin in diagnosis and clinical assessment of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2015;50(1):74–80. doi: 10.3109/00365521. 2014.987809

11. Ikhtaire S, Shajib MS, Reinisch W, Khan WI. Fecal calprotectin: its scope and utility in the management of inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2016;51(5):434–46. doi: 10.1007/s00535-016-1182-4

12. Alibrahim B, Aljasser MI, Salh B. Fecal calprotectin use in inflammatory bowel disease and beyond: a mini-review.

Can J Gastroenterol Hepatol. 2015;29(3):157–63. doi: 10.1155/2015/950286

13. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. F1000Res. 2020;9:F1000 Faculty Rev-69. Doi: 10.12688/f1000 research.20510.1

14. Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. Clin Gastroenterol Hepatol. 2012;10(10):1096–100. doi: 10.1016/j.cgh.2012.08.012

15. Iftekhar A, Sigal M. Defence and adaptation mechanisms of the intestinal epithelium upon infection. Int J Med Microbiol. 2021;311(3):151486. doi: 10.1016/j.ijmm.2021. 151486

16. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. Tissue Barriers. 2016;4(4):e1251384. doi: 10.1080/21688370.2016.1251384

17. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. Physiol Rev. 2011;91(1):151–75). doi: 10.1152/physrev.00003.2008

18. The World Medical Association Ethics Unit. Declaration of Helsinki [Internet]. 2024 [citado 2024 Ago 10]. Disponible en: http://www.wma.net/e/ethicsunit

19. American Psychiatric Association. Neurodevelopment disorders in: diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing; 2014.

20. Lord C, Rutter M, Di Lavore P, Risi S, Gotham K, Bishop S. ADOS-2. Escala de observación para el diagnóstico del autismo - 2. Manual (Parte I): módulos 1-4. Madrid: TEA Ediciones; 2015. p. 11–216.

21. Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G. GSRS—a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. Dig Dis Sci. 1988;33(2):129–34. doi: 10.1007/BF01535722

22. Moreno X, Santamaría G, Sánchez R, De La Torre B, Garcés F, Hernández C, et al. Microbiota gastrointestinal aeróbica en niños con trastorno del espectro autista. Estudio preliminar. Gen. 2015;69(2):36–44. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00 16-35032015000200004

23. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2023. Disponible en: https://www.scirp.org/ reference/referencespapers?referenceid=3582659

24. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. Neurogastroenterol Motil. 2013;25(1):4–15. doi: 10.1111/nmo.12046

25. Kang S, Denman S, Morrison M, Yu Z, Doré J, Leclerc M. Dysbiosis of faecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. Inflamm Bowel Dis. 2010;16(12):2034–42. doi: 10.1002/ibd.21319

26. Uranga JA, López-Miranda V, Lombó F, Abalo R. Food, nutrients and nutraceuticals affecting the course of inflammatory bowel disease. Pharmacol Rep. 2016;68(4):816–26. doi: 10.1016/j.pharep.2016.05.002

27. Jeffery IB, O'Toole PW, Öhman L, Claesson MJ, Deane J, Quigley EM, et al. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. Gut. 2012;61(7):997–1006. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301 501

28. Azhari A, Azizan F, Esposito G. A systematic review of gut-immune-brain mechanisms in autism spectrum disorder. Dev Psychobiol. 2019;61(5):752–71. doi: 10.1002/dev.2180 3

29. Coury DL, Ashwood P, Fasano A, Fuchs G, Geraghty M, Kaul A, et al. Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. Pediatrics. 2012;130(Suppl 2):S160–8. doi: 10.1542/peds.2 012-0900N

30. Horvath K, Perman JA. Autism and gastrointestinal symptoms. Curr Gastroenterol Rep. 2002;4(3):251–8. doi: 10.1007/s11894-002-0071-6.

31. Iovene MR, Bombace F, Maresca R, Sapone A, Iardino P, Picardi A, et al. Intestinal dysbiosis and yeast isolation in stool of subjects with autism spectrum disorders. Mycopathologia. 2017;182(3–4):349–63. doi: 10.1007/s110 46-016-0068-6

32. van De Sande MM, van Buul VJ, Brouns FJ. Autism and nutrition: the role of the gut-brain axis. Nutr Res Rev. 2014;27(2):199-214. doi: 10.1017/S0954422414000110

33. Julio-Pieper M, Bravo JA, Aliaga E, Gotteland M. Review article: intestinal barrier dysfunction and central nervous system disorders--a controversial association. Aliment Pharmacol Ther. 2014;40(10):1187-1201. doi: 10.1111/apt. 12950

34. de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Frolli A, Iardino P, et al. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-

degree relatives. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;51(4):418-24. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181dcc4a5

35. Esnafoglu E, Cırrık S, Ayyıldız SN, Erdil A, Ertürk EY, Daglı A, et al. Increased serum zonulin levels as an intestinal permeability marker in autistic subjects. J Pediatr. 2017;188:240-4. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.04.004

36. Fasano A. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: Living life on the edge of the wall. Am J Pathol. 2008;173:1243-52. doi: 10.2353/ajpath.2008.080651

37. Julio-Pieper M, Bravo JA, Aliaga E, Gotteland M. Review article: intestinal barrier dysfunction and central nervous system disorders—a controversial association. Aliment Pharmacol Ther. 2014;40(10):1187-201. doi: 10.1111/apt.12950