

**TESIS DOCTORAL**

**INFLUENCIA DE UNA DIETA LIBRE DE GLUTEN Y CASEÍNA  
SOBRE LAS ALTERACIONES DEL COMPORTAMIENTO EN  
NIÑOS Y ADOLESCENTES DIAGNOSTICADOS DE TRASTORNO  
DEL ESPECTRO AUTISTA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA CLÍNICA Y  
SALUD PÚBLICA**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

---

**Pablo José González Domenech**

Universidad de Granada

Octubre 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Pablo José González Domenech  
ISBN: 978-84-1306-397-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/58537>

INFLUENCIA DE UNA DIETA LIBRE DE GLUTEN Y CASEÍNA  
SOBRE LAS ALTERACIONES DEL COMPORTAMIENTO  
EN NIÑOS Y ADOLESCENTES DIAGNOSTICADOS  
DE TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

**Memoria para optar al grado de Doctor**

**Presentada por**

**Pablo José González Domenech**

Licenciado en Medicina y Cirugía

Médico Especialista en Psiquiatría

Alumno de Doctorado de la Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud.

Programa de Medicina Clínica y Salud Pública

Universidad de Granada

**Dirigida por**

**Dr. Francisco Díaz Atienza**

Profesor Asociado de Psiquiatría y Psicología Médica

Facultad de Medicina

Universidad de Granada

**Y**

**Dr. Luis Gutiérrez Rojas**

Profesor Contratado Doctor

Facultad de Medicina

Universidad de Granada

2019



“A mis padres y a mis hermanos;  
A Paloma y a mis hijos”



## **AGRADECIMIENTOS**

---

Al Dr. Francisco Díaz Atienza, Director de la presente tesis, por ser mi mentor y mi guía en la clínica e investigación de la psiquiatría infanto-juvenil. Le agradezco sinceramente su enorme entrega desde el inicio de mi formación.

Al Dr. Luis Gutiérrez Rojas, Director de la presente tesis, por su calidad humana y científica. Sin su talante y sin su empuje en el tramo final de esta tesis habría sido muy difícil llegar hasta aquí.

Al Dr. Manuel Gurpegui Fernández de Legaria, Tutor de la presente tesis, por acompañarme durante toda mi andadura de posgrado, por su rigor científico, por su tesón y permanente disponibilidad.

Al Dr. José María Martínez Ortega, por su amistad desde el inicio de la residencia, por su cercanía y generosidad.

A la Dra. María Luisa Fernández Soto, Profesora Titular de la Universidad de Granada y Facultativo Especialista de Área en Endocrinología y Nutrición, por su asesoramiento en todo lo relacionado con el protocolo de implementación y seguimiento de las intervenciones dietéticas.

A la Dra. Prado Ayala Muñoz, por compartir generosamente sus conocimientos sobre péptidos en autismo recopilados en su brillante tesis doctoral.

A D. Óscar Herreros Rodríguez, Facultativo Especialista de Área en Psiquiatría, por sus sugerencias en torno a la elaboración de esta tesis doctoral y por su generosidad a la hora de transmitir y compartir sus conocimientos en la clínica e investigación de la psiquiatría infanto-juvenil.

A D. Pedro Bustos de Abajo, a Dña. Isabel Beltrán Velasco, a D. José Guerrero Velázquez, a Dña. Gloria Roldán Maldonado, a D. Diego Vico Cano, a D. Carlos Martínez Hinojosa y al resto de compañeros y amigos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, por su apoyo y amistad durante la residencia. A D. José Juan Muro Romero, a Dña. Inmaculada Sánchez Hita y a la Dra. Lourdes

Anllo Vento, compañeros de profesión y amigos desde que inicié mi trabajo clínico como especialista en Psiquiatría.

A la Asociación Española de Psiquiatría del Niño y el Adolescente (AEPN-yA), que me concedió una beca gracias a la cual ha sido posible desarrollar mi investigación.

A toda mi familia, en particular a mi hermana, por ser un ejemplo de talento, sacrificio y vocación durante toda su brillante carrera académica. A Paloma, por su paciencia infinita, sin su cariño y su apoyo no habría sido posible llegar hasta aquí. A mis hijos, Pablo y Paloma, por ser mi impulso y mi motivación para seguir trabajando y mejorando cada día.

Por último, mi más sincero agradecimiento a los pacientes y familiares que han prestado su imprescindible colaboración para la realización de los dos ensayos clínicos que han dado lugar a esta tesis doctoral.



## ÍNDICE

---

RESUMEN .....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	17
1.1. Trastornos del Espectro Autista (TEA): Definición y epidemiología... ..	17
1.1.1. Definición .....	17
1.1.2. Epidemiología .....	17
1.2. Etiología .....	18
1.2.1. Factores genéticos .....	19
1.2.2. Factores ambientales .....	19
1.2.3. Epigenética .....	21
1.3. Intervenciones nutricionales y dietéticas en el autismo .....	22
1.3.1. Vitaminas y minerales .....	23
1.3.2. Aminoácidos .....	25
1.3.3. Ácidos grasos omega-3 .....	26
1.3.4. Prebióticos, probióticos y enzimas digestivas .....	27
1.3.5. Intervenciones dietéticas .....	28
1.4. Dietas libres de gluten y caseína (DLGC) .....	30
1.4.1. Introducción .....	30
1.4.1.1. Gluten .....	30
1.4.1.2. Caseína .....	32
1.4.2. Evidencia de las DLGC en los TEA .....	33
1.4.2.1. Estudios con resultados positivos .....	33
1.4.2.2. Estudios con resultados negativos .....	35
1.4.2.3. Otros estudios sobre DLGC .....	37
1.4.2.4. Trabajos de revisión.....	38
1.4.3. Aspectos de riesgo y seguridad derivados del uso de las DLGC.....	40

1.5. Beta-casomorfinina .....	42
1.5.1. Teoría intestino-cerebral del autismo .....	42
1.5.2. Síntomas gastrointestinales en los TEA .....	44
1.5.3. Péptidos en orina .....	46
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	51
3. SUJETOS Y MÉTODO .....	53
3.1. Informe de la comisión de ética e investigación sanitaria y fuentes de financiación para la investigación .....	53
3.2. Diseño de los estudios y flujo de participantes .....	53
3.3. Tamaño de las muestras .....	54
3.4. Criterios de inclusión .....	54
3.5. Criterios de exclusión .....	55
3.6. Variables e instrumentos de evaluación .....	55
3.7. Estudio estadístico .....	60
4. RESULTADOS .....	61
4.1. Resultados del primer estudio (3 + 3 meses de seguimiento) .....	61
4.1.1. Análisis de la muestra al inicio del estudio .....	61
4.1.2. Análisis comparativo de los grupos A y B al inicio del estudio...	62
4.1.3. Flujo de participantes a lo largo del estudio .....	63
4.1.4. Resultados de las variables e instrumentos de evaluación en T0, T1 y T2 .....	65
4.2. Resultados del segundo estudio (6 + 6 meses de seguimiento) .....	69
4.2.1. Análisis de la muestra al inicio del estudio .....	69
4.2.2. Análisis comparativo de los grupos A y B al inicio del estudio...	71
4.2.3. Flujo de participantes a lo largo del estudio .....	72
4.2.4. Resultados de las variables e instrumentos de evaluación en T0, T1 y T2 .....	74
5. DISCUSIÓN .....	81
5.1. Discusión de los resultados .....	81
5.1.1. Cuestionarios de conducta .....	81
5.1.2. Protocolo de adherencia a la dieta .....	84
5.1.3. Niveles de beta-casomorfinina en orina .....	85
5.1.4. Parámetros de riesgo y seguridad .....	87

5.1.5. Antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario .....	88
5.2. Fortalezas y limitaciones .....	89
5.2.1. Fortalezas .....	89
5.2.2. Limitaciones .....	91
5.3. Perspectivas futuras .....	91
6. CONCLUSIONES .....	93
7. BIBLIOGRAFÍA .....	95
ANEXOS .....	121
Anexo 1: Informe del Comité de Ética de la Investigación de Centro de Granada .....	123
Anexo 2: Fuentes de financiación para la investigación .....	124
Anexo 3: Consentimiento informado .....	128
Anexo 4: Guía de implementación de la DLGC .....	131
Anexo 5: Escala de evaluación de tratamiento en el autismo (escala ATEC) .....	143
Anexo 6: Evaluación resumida del comportamiento (escala ERC-III) .....	147
Anexo 7: Escala de conducta aberrante (escala ABC) .....	149
Anexo 8: Cuestionario de frecuencia de alimentos (cuestionario FFQ)...	151
Anexo 9: Recuerdo de 24 horas .....	156
Anexo 10: Encuesta de antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario .....	158
Anexo 11: Compromiso de respeto de los derechos de autor .....	160
Anexo 12: González-Domenech et al. /Mental Health Research in Intellectual Disabilities. Publicado on-line: 30 agosto 2019. <a href="https://doi.org/10.1080/19315864.2019.1654574">https://doi.org/10.1080/19315864.2019.1654574</a> .....	161
Anexo 13: González-Domenech et al. Enviado para publicar .....	181
Anexo 14: Introducción de la tesis propuesta para publicación de artículo de revisión en Autism Research (Factor de impacto: 4,532) .....	211



## RESUMEN

---

Dadas las limitaciones en el tratamiento de los Trastornos del Espectro Autista (TEA), muchas familias recurren al uso de intervenciones alternativas. La dieta libre de gluten y caseína (DLGC) como enfoque etiopatogénico y terapéutico de los TEA ha recibido abundante atención bibliográfica y sigue siendo actualmente objeto de interés y controversia. La beta-casomorfinina es un péptido derivado de las proteínas de la leche de vaca, llamada así por su procedencia (caseína) y por su actividad opioide similar a la morfina. Se ha postulado que los sujetos con TEA podrían tener altas concentraciones de estos biopéptidos que influirían en el origen y en el curso de los síntomas nucleares y periféricos del autismo. Los objetivos de esta investigación son: 1) Determinar la influencia de una DLGC sobre las alteraciones del comportamiento de niños y adolescentes diagnosticados de TEA y 2) Estudiar la relación entre los posibles cambios conductuales y los niveles urinarios de beta-casomorfinina.

Se realizaron dos estudios de similares características pero con periodos de seguimiento diferentes, en diferentes momentos de tiempo y utilizando muestras distintas. Primero se realizó un estudio a 3 + 3 meses de seguimiento y años más tarde se replicó la metodología para un segundo estudio en el que se amplió el tiempo de intervención a 6 + 6 meses. El tipo de diseño escogido para ambos estudios fue un ensayo clínico aleatorizado cruzado a simple ciego. El periodo de seguimiento se dividió en dos fases de la misma duración cada una (tres meses para el primer estudio y seis meses para el segundo). Cada participante recibió durante una fase dieta normal (con gluten y caseína) y durante la otra fase DLGC. Se asignó aleatoriamente el orden de intervención (empezar con dieta normal o DLGC) y se realizaron tres evaluaciones a lo largo del seguimiento (al inicio de cada estudio, tras la dieta normal y tras la DLGC). En cada evaluación se cumplimentaron cuestionarios de conducta y autismo, de seguimiento de la dieta y se determinaron los niveles de beta-casomorfinina en orina.

En ninguno de los dos estudios (3 + 3 meses y 6 + 6 meses) se encontraron cambios significativos en las escalas de conducta ni en los niveles urinarios de beta-casomorfinina tras la DLGC.

Una DLGC no produce cambios significativos en los síntomas comportamentales del autismo ni en los niveles urinarios de beta-casomorfina. Son necesarios futuros estudios que, además de eliminar el gluten y la caseína durante un periodo de tiempo suficiente (al menos 6 meses), incluyan elementos de placebo y doble ciego, así como otros marcadores biológicos para definir mejor a los sujetos que puedan beneficiarse de estas dietas.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA): DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

### 1.1.1. *Definición*

El autismo forma parte de un grupo heterogéneo y complejo de trastornos del neurodesarrollo que denominamos genéricamente bajo el nombre de Trastornos del Espectro Autista (TEA) y que según criterios de la quinta edición del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-5) se manifiesta a través de dos tipos de síntomas: deficiencias persistentes en la comunicación y en la interacción social y patrones restrictivos y estereotipados de comportamientos, intereses o actividades. Estos son los llamados síntomas nucleares del autismo. Además, existen otros síntomas denominados periféricos que acompañan a la presentación clínica de estos trastornos y que incluyen alteraciones sensorceptivas (Amy, 2017), dificultades en la coordinación motora (Whyatt y Craig, 2012) y problemas gastrointestinales (Buie *et al.*, 2010; Díaz-Atienza *et al.*, 2012; Margolis *et al.*, 2019), entre otros.

### 1.1.2. *Epidemiología*

La prevalencia de los TEA es un tema sujeto a controversia. Diversos estudios epidemiológicos (Boyle *et al.*, 2011; Elsabbagh *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010) han señalado un aumento en las cifras de prevalencia del autismo durante las últimas décadas. Actualmente, se estiman valores a nivel de población mundial de entre el 0,62 y el 0,70% (Fombonne, 2009), incluso superiores según los datos de otros autores (Baron-Cohen *et al.*, 2009; Zablotsky *et al.*, 2015).

No queda claro con qué intensidad han crecido las tasas de prevalencia de los TEA ni los factores que han motivado dicho crecimiento. Fombonne revisó 43 estudios en 2009 y postuló que el aumento de la prevalencia del trastorno

podría ser debido a factores como la mayor precisión en el diagnóstico, la amplitud de los criterios nosológicos, la mejora de los servicios de atención y la forma en la que se ha extendido el concepto. Hoy sabemos que los TEA engloban a un grupo muy amplio de individuos, que abarca desde las personas capaces de tener una vida independiente hasta los casos que llevan asociada una grave repercusión en la funcionalidad y calidad de vida (Farley *et al.*, 2009 y 2018). Posar y Visconti revisaron en 2017 las causas del aumento de la prevalencia del autismo desde el rol que desempeñan los factores ambientales en su etiopatogenia. Examinaron la polución del aire, los pesticidas, las vacunas y los factores dietéticos, entre otros. Por último, hay que tener presente que desde la década de 1960 hasta hoy el conocimiento de estos trastornos ha mejorado considerablemente gracias a la cantidad y a la calidad de los estudios de investigación en TEA, que han experimentado un crecimiento exponencial similar al de las cifras de prevalencia.

La incidencia de los TEA es de 3 a 5 veces superior en varones que en mujeres (Lai *et al.*, 2015), aunque esta diferencia se reduce cuando el autismo está asociado a discapacidad intelectual (Fombonne *et al.*, 2005a y 2005b). Es probable que expresiones clínicas más sutiles del trastorno en mujeres sean infra-diagnosticadas (Landa *et al.*, 2007). El autismo se asocia con frecuencia a otros trastornos del neurodesarrollo como la discapacidad intelectual o los trastornos del aprendizaje y a otras enfermedades neurológicas como la epilepsia (Steffenburg *et al.*, 2003), lo cual refuerza la importancia de la base neurológica de estos trastornos. Otra área importante de comorbilidad es la gastrointestinal (Pusponegoro *et al.*, 2015b), en la que encontramos una estrecha relación entre autismo y trastornos digestivos como la Enfermedad Celíaca (Genuis y Bouchard, 2010) o la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Ashwood *et al.*, 2003).

## 1.2. ETIOLOGÍA

La etiología del autismo es el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos (Devlin y Scherer, 2012) y ambientales (Herbert, 2010) que inciden de forma variable en etapas críticas del neurodesarrollo temprano (Grifodatskaya, 2010; Wiśniowiecka-Kowalnik y Nowakowska, 2019). Las pruebas genéticas señalan que los TEA son un grupo de enfermedades diferentes en sus mecanismos patofisiológicos, pero con un fenotipo (manifestaciones clínicas) similar. Por otro lado, la amplia variabilidad clínica encontrada en los TEA apoya su compleja etiopatogenia.



### 1.2.1. Factores genéticos

Los trastornos del neurodesarrollo y dentro de ellos los TEA, son probablemente los “más genéticos” dentro de la Psiquiatría (el riesgo entre hermanos es 50-75 veces mayor que en la población general). Al menos un 10% de los casos son de origen genético monogénico, como ocurre en los síndromes de Angelman, Apert o Cowden, entre otros (Eiris-Puñal *et al.*, 2008; Rauch *et al.*, 2006). Pero en la mayor parte de los casos, el autismo (al igual que el resto de enfermedades de transmisión poligénica) no se rige por patrones de herencia monogénicos mendelianos, sino que es considerado como un complejo grupo de síndromes genéticos con variaciones múltiples en múltiples genes (Muhle *et al.*, 2004).

Antes se pensaba que la mayor fuente de variación genética entre individuos se encontraba en los polimorfismos de nucleótido simple o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) pero actualmente los estudios dan una mayor importancia a las variaciones en el número de copias o CNVs (*Copy Number Variants*) (El-Fishawy y State, 2010). Se conocen más de 700 loci genéticos relacionados con TEA. Estas cifras van aumentando con el paso del tiempo y pueden consultarse y actualizarse en diferentes bases de datos como la *Database of Genomic Variants* (Macdonald *et al.*, 2013) o la *NCBI Single Nucleotide Polymorphism Database* (Kitts y Sherry, 2002). Los genes identificados hasta el momento se han relacionado con diversas funciones biológicas en el sistema nervioso central (neurotransmisión, crecimiento, migración y diferenciación neuronales), en el sistema inmune y en el área gastrointestinal (Campbell *et al.*, 2008).

La tasa de diagnóstico genético en los TEA se ha duplicado en los últimos años, situándose actualmente en torno al 15%, gracias a la aparición y sofisticación de nuevas técnicas de análisis molecular como los array-CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) que van permitiendo progresivamente que el diagnóstico genético en los trastornos del neurodesarrollo sea incorporado a la práctica clínica (Waye y Cheng, 2018).

### 1.2.2. Factores ambientales

Muchas de las variaciones genéticas mencionadas anteriormente se presentan *de novo* y es en este sentido donde cobran una mayor importancia los factores ambientales asociados al autismo, que quedan aún por esclarecer. Entre ellos, destacan los agentes infecciosos y tóxicos (Hertz-Picciotto *et al.*, 2018).

En 1998, el Dr. Andrew Wakefield, un gastroenterólogo británico, hipotetizó que la fracción anti-sarampionosa de la vacuna triple vírica podría ocasionar

una malabsorción intestinal con la consecuente participación de neuropéptidos tóxicos en la etiopatogenia de los TEA. Esto generó una enorme controversia en torno al tema y una importante alarma social con consecuencias para la salud pública (Flaherty, 2011). En 2010, el artículo vinculado a esta polémica fue retirado de la revista *Lancet* al demostrarse que la investigación se había realizado fraudulentamente con fines económicos. Se cerró así este debate, pero para entonces ya había dejado una rémora de dudas injustificadas sobre la seguridad en la vacunación infantil y había provocado, además, que se agotara una posible línea de investigación sobre el sistema digestivo en los TEA.

El estudio CHARGE (*CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment*), encabezado por Hertz-Picciotto, se inició como proyecto a gran escala en el año 2003 con el propósito de investigar los factores de riesgo genéticos y ambientales asociados a los TEA, utilizando para ello una amplia muestra de casos y controles. Tres años más tarde, en 2006, estos investigadores pusieron en marcha el estudio MARBLES (*Markers of Autism Risk in Babies-Learning Early Signs*), en esta ocasión con un diseño prospectivo. Seleccionaron a mujeres embarazadas que previamente habían tenido uno o más hijos diagnosticados de TEA, y recogieron datos y muestras biológicas durante el embarazo, en el nacimiento y hasta que los niños cumplieran tres años de edad, haciendo así un seguimiento de todo el neurodesarrollo temprano. Los resultados preliminares de este estudio han sido publicados recientemente (Hertz-Picciotto *et al.*, 2018). A continuación, describimos algunos de los agentes ambientales más relevantes que han sido investigados a partir de estos y de otros estudios.

El metil-mercurio, como agente químico industrial, ha sido relacionado con la etiopatogenia de los trastornos del neurodesarrollo (Grandjean y Landrigan, 2006) y durante las tres últimas décadas se han publicado numerosos estudios que investigan la asociación entre mercurio y autismo. La muestra del estudio CHARGE fue utilizada para comparar las concentraciones en sangre de mercurio entre sujetos con TEA y controles (Hertz-Picciotto *et al.*, 2010); otros investigadores han determinado los niveles de mercurio en diferentes fluidos y tejidos corporales como la orina (Wright *et al.*, 2010), el tejido cerebral (Khan *et al.*, 2014), el pelo (Holmes *et al.*, 2003) o los dientes (Adams *et al.*, 2007), entre otros. Los trabajos actuales de revisión y meta-análisis en torno a este tema (Jafari *et al.*, 2017; Kern *et al.*, 2016) consideran que el mercurio es un importante factor causal en el autismo y sugieren que los mecanismos de detoxificación y excreción podrían estar alterados en estos sujetos, lo que conllevaría a una acumulación de esta sustancia en el organismo. Además del mercurio, otros metales pesados como el plomo, el aluminio, el arsénico o el cadmio han sido identificados en altas concentraciones en sujetos con TEA (Tabatadze *et al.*, 2015).

Dentro de los agentes que pueden tener acción tóxica durante el embarazo, especialmente durante el primer trimestre, algunos psicofármacos como el ácido valproico (Rasalam *et al.*, 2005) o los antidepresivos (Croen *et al.*, 2011) se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar autismo. Shelton y colaboradores (2014) estudiaron la posible relación entre la exposición prenatal a pesticidas y el desarrollo de autismo. Hallaron que aproximadamente un tercio de las madres del estudio CHARGE vivieron durante el embarazo en un radio de 1,5 kilómetros de lugares donde se aplicaban pesticidas agrícolas, particularmente órgano-fosfatos. Otras sustancias tóxicas relacionadas con los TEA son los polucionantes ambientales procedentes del tráfico rodado (Volk *et al.*, 2011) y los polibromodifenil éteres (PBDEs), que son sustancias químicas usadas como aditivos en plásticos y que están presentes en el aire y en los alimentos (Wong y Giulivi, 2016).

Por último, también han sido descritos agentes ambientales como factores de protección para el riesgo de desarrollar autismo. Schmidt y colaboradores (2012) estudiaron la ingesta de ácido fólico periconcepcional y concluyeron que el uso de este suplemento podría reducir el riesgo de autismo en aquellos individuos con un metabolismo del folato ineficiente. El uso de suplementos nutricionales como intervención terapéutica en los TEA constituye en sí mismo un área extensa y muy relacionada, además, con el objeto de estudio de esta tesis doctoral, por lo que ocupará un capítulo aparte (ver 1.3 *intervenciones nutricionales y dietéticas en el autismo*).

### 1.2.3. Epigenética

La concordancia en autismo entre gemelos idénticos es alta pero no alcanza el 100% (Bailey *et al.*, 1995), lo que sugiere la participación de mecanismos epigenéticos en la etiología de los TEA (Waye y Cheng, 2018). En diversos síndromes genéticos comórbidos con el autismo como los síndromes de Rett, X-Fragil, Prader Willi o Angelman, entre otros, se ha demostrado la existencia de mecanismos de disregulación epigenética. La metilación del ADN está relacionada con alteraciones en el desarrollo cerebral temprano y constituye el mecanismo más importante de alteración en la estructura del ADN. El gen MECP2 (*methyl-CpG-binding protein 2*), cuya mutación causa el Síndrome de Rett, es considerado un lector de información epigenética y un modulador de la arquitectura cromatínica (Della Ragione *et al.*, 2016). Diversos estudios han sido llevados a cabo bajo la hipótesis de que las alteraciones en las vías enzimáticas de la folato-metionina pueden jugar un papel en la etiopatogenia del autismo (Ray, 2016). Otro mecanismo capaz de producir cambios epigenómicos es la acetilación de las histonas (Zhan *et al.*, 2014).

Los estudios de epigenética, en general, son más complejos de llevar a cabo que los de genética, ya que los marcadores a estudiar van cambiando a lo largo del tiempo. El énfasis actual reside en estudiar los factores perinatales etiopatogénicos relacionados con el autismo empleando los avances alcanzados en las técnicas de genómica (McCaulley, 2019).

### 1.3. INTERVENCIONES NUTRICIONALES Y DIETÉTICAS EN EL AUTISMO

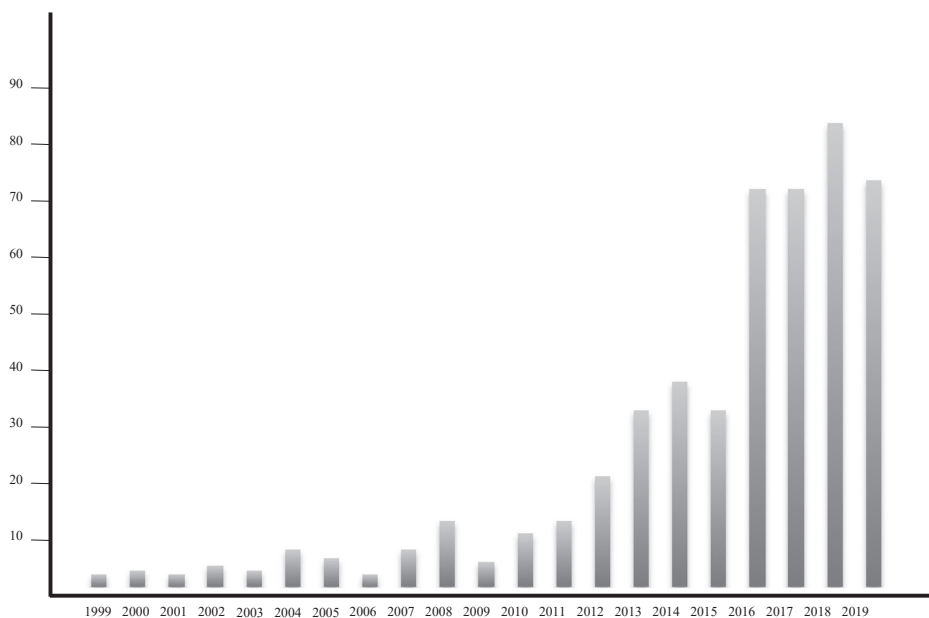
Desde que fuera descrito por primera vez el autismo en 1943 por Leo Kanner, lo esencial del tratamiento de estos trastornos no ha variado considerablemente. En la actualidad, siguen establecidos como pilares terapéuticos las intervenciones psicoeducativas (Reichow *et al.*, 2014) y el manejo psicofarmacológico cuando aparecen alteraciones conductuales (Hirsch *et al.*, 2016). Debido a estas limitaciones en el tratamiento de los TEA, muchas familias recurren a otros métodos alternativos (Owen-Smith *et al.*, 2015; Salomone *et al.*, 2015), a menudo sin supervisión médica. Los resultados de un estudio de reciente publicación (Trudeau *et al.*, 2019) mostraron que hasta el 33% de los padres ocultaban la información de los suplementos al médico responsable del tratamiento de sus hijos.

Las intervenciones nutricionales y dietéticas en el autismo, por lo tanto, han experimentado un gran impacto social y mediático en los últimos años (Herbert y Weintraub, 2013b), son utilizadas hasta en un 40% de los niños con TEA (Perrin *et al.*, 2012) y han recibido una creciente y abundante atención bibliográfica en la literatura científica (Figura 1). Se han reportado mejorías en los síntomas nucleares y periféricos de los TEA tras la instauración de dietas específicas de exclusión (El Rashidy *et al.*, 2017; Ghalichi *et al.*, 2016; Knivsberg *et al.*, 1990, 1995 y 2002; Lucarelli *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2014; Whiteley *et al.*, 1999 y 2010a) y/o el uso variable de suplementos nutricionales como vitaminas, minerales, aminoácidos y ácidos grasos (Adams *et al.*, 2011 y 2018; Amminger *et al.*, 2007; Bent *et al.*, 2011 y 2014; Bertoglio *et al.*, 2010; Grimaldi *et al.*, 2018; Hendren *et al.*, 2016; Nikoo *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a; Voigt *et al.*, 2014; Yui *et al.*, 2012).

Los trabajos de revisión y síntesis en este área (Castro *et al.*, 2015; Cekici y Sanlier, 2019; Doenyas, 2018; Fond *et al.*, 2015; Marí-Bauset *et al.*, 2014; Millward *et al.*, 2008; Mulloy *et al.*, 2010; Piwowarczyk *et al.*, 2018; Sathe *et al.*, 2017; Srikantha y Mohajeri, 2019; Whiteley *et al.*, 2010b) sugieren que no existe suficiente evidencia científica para recomendar el uso indiscriminado de estas intervenciones en los TEA y que son necesarias futuras líneas de investigación con aplicación directa a la práctica clínica, que estudien marcadores del esta-

do inflamatorio, enzimático y de los micronutrientes para identificar posibles sujetos respondedores, así como mujeres candidatas que durante el embarazo puedan beneficiarse de suplementación o de intervenciones dietéticas para reducir el riesgo de TEA.

A continuación se describen las intervenciones nutricionales y dietéticas más relevantes, analizando en un capítulo aparte (apartado 1.4) las dietas libres de gluten y caseína (DLGC) que constituyen el tema central de la presente tesis doctoral.



**Figura 1. Tendencia creciente del número de estudios publicados por año sobre nutrición y autismo desde 1999 hasta 2019.**

### 1.3.1. Vitaminas y minerales

La suplementación con vitaminas y/o minerales está considerada la intervención nutricional más comúnmente utilizada entre los padres y cuidadores de personas con TEA (Bjørklund *et al.*, 2019), a pesar de que no existe evidencia suficiente para recomendarla como tratamiento en el autismo (Sathe *et al.*, 2017). En general, los estudios sobre el uso de vitaminas y minerales en los TEA muestran heterogeneidad en una serie de aspectos metodológicos como el tipo y dosis de suplemento, el tamaño de muestra (en un rango desde 12 hasta 60 sujetos), el tiempo de seguimiento (desde 8 hasta 35 semanas) y los instrumentos de evaluación utilizados (en algunos casos con escalas no estandarizadas para el diagnóstico y seguimiento de los TEA). Frecuentemente, la suplementación

con vitaminas y minerales se usa en combinación con otras estrategias de tratamiento neurológicas y psicológicas de eficacia demostrada (Adams *et al.*, 2011).

Diversas investigaciones han relacionado la fisiopatogenia del autismo con alteraciones en el estrés oxidativo, en la función mitocondrial y en determinados procesos metabólicos como la sulfatación o la metilación sugiriendo que los sujetos con TEA presentan un perfil metabólico y nutricional diferente al de los niños con desarrollo típico. Algunos estudios muestran niveles séricos más bajos de vitaminas y minerales en niños con autismo en comparación con los controles sanos (Adams *et al.*, 2011; Cannell, 2017).

Las vitaminas del grupo B, sustancias hidrosolubles adquiridas íntegramente a través de la dieta, desempeñan un papel fundamental en el neurodesarrollo, sobre todo las vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> y B<sub>12</sub>.

Es conocido desde hace décadas que el déficit de ácido fólico (Vitamina B<sub>9</sub>) durante la embriogénesis está relacionado con defectos en la formación del tubo neural (Seller, 1994). Asimismo, los niveles bajos de folatos se han asociado a otros trastornos neurológicos y psiquiátricos como las demencias (Ramaekers *et al.*, 2002) y los trastornos afectivos (Fava y Mischoulon, 2009). También se ha sugerido que la ingesta de ácido fólico durante el embarazo puede reducir el riesgo de TEA en la descendencia, aunque los resultados hasta el momento no son del todo concluyentes (Bjørklund *et al.*, 2019). El ácido fólico ha sido utilizado en combinación con la vitamina B<sub>12</sub> para el tratamiento del estrés oxidativo de niños con autismo (James *et al.*, 2009).

La vitamina B<sub>12</sub> o cobalamina es un cofactor esencial en diversos procesos metabólicos y está estrechamente relacionada con la síntesis y regulación del ADN. Su forma semisintética es la cianocobalamina, presente en multitud de suplementos vitamínicos. Se ha observado una mejoría en la capacidad de metilación y del estado oxidativo de niños con TEA tras la suplementación con vitamina B<sub>12</sub> (Hendren *et al.*, 2016), sin embargo, estos hallazgos no se han acompañado de cambios significativos en los síntomas nucleares y periféricos del autismo. Bertoglio y colaboradores (2010) realizaron un ensayo clínico a doble ciego de diseño cruzado con 30 niños con TEA suplementados durante 12 semanas con vitamina B<sub>12</sub>. No se hallaron diferencias significativas entre los grupos, tan solo se obtuvieron algunos efectos beneficiosos medidos a través de la escala de impresión clínica global. La vitamina B<sub>6</sub> o piridoxina actúa como coenzima en reacciones metabólicas relacionadas con los lípidos, carbohidratos y aminoácidos. Algunos estudios la recomiendan como complemento en el tratamiento de los síntomas autísticos, sin embargo, las revisiones en torno a este tema concluyen que estos trabajos presentan importantes limitaciones, como el tamaño de muestra y los instrumentos de evaluación utilizados (Marti, 2014).

La vitamina C o ácido ascórbico es muy conocida por sus propiedades antioxidantes (Arrigoni y De Tullio, 2002) y su uso en el autismo se ha relacionado con algunos resultados positivos en ciertas subescalas de sensorio-motricidad (Dolske *et al.*, 1993).

El interés por investigar los efectos de la vitamina D en determinadas áreas de la psiquiatría, especialmente en los trastornos del estado de ánimo (Berk *et al.*, 2007), ha aumentado durante los últimos años. La vitamina D juega un papel crucial en el crecimiento de los huesos y en el desarrollo. Diversos estudios han encontrado niveles más bajos de Vitamina D en niños con autismo (Cannell, 2017) y otros trabajos han hallado una disminución en el grosor de la cortical ósea de niños con TEA, relacionándolo con el uso de dietas que restringen el aporte de calcio procedente de los productos lácteos (Hediguer *et al.*, 2008).

El magnesio, el cobre y el selenio son minerales implicados en las funciones cerebrales, ya que actúan como cofactores en las reacciones necesarias para la síntesis de neurotransmisores (Adams *et al.*, 2011). En la práctica clínica, lo más común es la coadministración de vitaminas y minerales, fundamentalmente la piridoxina con el magnesio (Findling *et al.*, 1997; Martineau *et al.*, 1985; Tolbert *et al.*, 1993), por lo que no existen hasta la fecha estudios que investiguen los efectos de los minerales en el autismo de forma aislada.

### 1.3.2. Aminoácidos

El uso de N-acetilcisteína (precursor del aminoácido cisteína) en los TEA se fundamenta en, al menos, dos de los múltiples modelos fisiopatogénicos descritos en el autismo: el desbalance en la neurotransmisión del glutamato (Purcell *et al.*, 2001) y el aumento del estrés oxidativo (Damodaran y Arumugam, 2011). Como agente antiglutamatérgico y antioxidante, la N-acetilcisteína ha sido utilizada en otros trastornos como la tricotilomanía, el trastorno obsesivo-compulsivo, la esquizofrenia o los trastornos afectivos, entre otros (Deepmala *et al.*, 2015). En el caso de los TEA, Gogou y Kolios (2017) en su revisión sistemática seleccionaron 4 ensayos clínicos controlados (Ghanizadeh y Moghimi-Sarani, 2013; Hardan *et al.*, 2011; Nikoo *et al.*, 2015; Wink *et al.*, 2016) y concluyeron que la N-acetilcisteína puede ser efectiva en el tratamiento de la irritabilidad en niños con autismo. Cabe destacar que los cuatro trabajos presentaron homogeneidad en cuanto al diseño del estudio, tamaño de muestra, tiempo de seguimiento y resultados de las variables principales (irritabilidad). No obstante, debido a la discrepancia entre los estudios en cuanto a la dosis de N-acetilcisteína utilizada, no se puede establecer de forma fiable una recomendación de este suplemento, más aún cuando en dos de estos ensayos clínicos se utilizó



la N-acetilcisteína en tratamiento combinado con Risperidona (Ghanizadeh y Moghimi-Sarani, 2013; Nikoo *et al.*, 2015). Hay otro ensayo clínico aleatorizado y controlado con placebo que no fue incluido en la revisión de Gogou y Kolios y que no mostró diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y control (Dean *et al.*, 2017). La principal limitación de este trabajo es el uso de dosis bajas de N-acetilcisteína.

La D-cicloserina y la N-dimetilglicina han sido también utilizadas como suplementos de aminoácidos para el tratamiento de los síntomas del autismo, aunque con resultados escasos y controversiales (Kern *et al.*, 2001; Minshawi *et al.*, 2016; Posey *et al.*, 2004).

### 1.3.3. Ácidos grasos omega-3

Los popularmente conocidos como “omega 3”, son un grupo específico de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que juegan un papel esencial en el crecimiento, la función inmune y el neurodesarrollo (Shulkin *et al.*, 2016). Los dos más utilizados como suplementos alimentarios son el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), ya que el organismo no es capaz de sintetizarlos y deben ser ingeridos a través de ciertos alimentos (pescados, mariscos, frutos secos, aceites, etc.) o de preparados comerciales.

El EPA y el DHA son ortomoléculas que recubren las membranas neuronales y que, por lo tanto, juegan un papel fundamental en la estructura y función del cerebro. Por ello, han sido estudiados para el tratamiento de múltiples trastornos psiquiátricos y del neurodesarrollo, incluyendo el autismo (Bent *et al.*, 2014; Voigt *et al.*, 2014; Yui *et al.*, 2012), la esquizofrenia (Amminger *et al.*, 2007 y 2010), los trastornos afectivos (Pompili *et al.*, 2017) y el Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) (Chang *et al.*, 2018), siendo en éste último donde más trabajos se han publicado y donde existe mayor grado de evidencia y recomendación.

En 2017, Agostoni y colaboradores publicaron los resultados de una revisión sistemática sobre el uso de ácidos grasos omega-3 en tres trastornos del neurodesarrollo: la psicosis de inicio temprano, el TDAH y el autismo. Dentro de los TEA, la revisión incluyó tres ensayos clínicos controlados y aleatorizados (Bent *et al.*, 2014; Voigt *et al.*, 2014; Yui *et al.*, 2012). En conclusión, los resultados mostraron un efecto muy discreto en los síntomas de niños con autismo tras el uso de suplementación con ácidos grasos. Después de esta revisión se han publicado dos ensayos clínicos que conviene mencionar. El primero de ellos fue llevado a cabo por el grupo de investigación del Hospital Gregorio Marañón de Madrid, encabezado por la Dra. Parellada (2017). Se trata de un ensayo clínico de diseño



cruzado aleatorizado y controlado para investigar el efecto de la suplementación con omega-3 durante 8 semanas en niños y adolescentes diagnosticados de TEA. Los resultados mostraron una mejoría en ciertos síntomas autísticos y un mayor balance de la ratio omega-6/omega-3 medida a través de las membranas de los eritrocitos. El segundo estudio fue llevado a cabo por Mazahery y colaboradores (2019), quienes evaluaron el efecto del uso combinado y por separado de vitamina D y ácidos grasos en los síntomas nucleares (Mazahery *et al.*, 2019b) y periféricos del autismo (Mazahery *et al.*, 2019a), hallando algunos resultados positivos respecto al uso de placebo.

A modo de conclusión, podemos afirmar que actualmente no existe una evidencia suficiente para recomendar el uso de ácidos grasos en el tratamiento de los síntomas nucleares y periféricos del autismo (Sathe *et al.*, 2017) y que son necesarios ensayos clínicos aleatorizados a doble ciego de mayor calidad (tamaño muestral, tiempo de seguimiento, instrumentos de evaluación, etc.) para clarificar el efecto de estas intervenciones en poblaciones y subpoblaciones de autismo.

#### 1.3.4. Prebióticos, probióticos y enzimas digestivos

Prebióticos y probióticos no son términos sinónimos y conviene diferenciarlos. Los alimentos prebióticos son sustancias no digeribles capaces de producir cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal. Los más investigados son los galacto-oligosacáridos (Mohajeri *et al.*, 2018). Los alimentos probióticos son aquellos que contienen microorganismos vivos capaces de sobrevivir a la digestión y llegar hasta el colon donde producen diversos efectos beneficiosos para la salud, como la restitución de la flora y de la barrera intestinales, la estimulación del sistema inmune, el aumento de la producción de mucina, etc. Los dos probióticos más utilizados son los *Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus spp* (Fond *et al.*, 2015).

La investigación con prebióticos como opción terapéutica en los TEA es hasta el momento más escasa (Grimaldi *et al.*, 2017 y 2018) que la atención bibliográfica que ha recibido el estudio de los probióticos. Se acaba de publicar una revisión sistemática (Liu *et al.*, 2019b y 2019c) de los ensayos clínicos disponibles hasta el momento sobre el uso de probióticos en el tratamiento de los síntomas comportamentales y gastrointestinales asociados a los TEA. La revisión incluye dos ensayos clínicos controlados y aleatorizados que muestran efectos positivos en los síntomas conductuales (Liu *et al.*, 2019a; Parracho *et al.*, 2010) y tres ensayos clínicos abiertos que señalan una tendencia a la mejoría (Kaluzna-Czaplinska y Blaszczyk, 2012; Shaaban *et al.*, 2018; West *et*

*al.*, 2014). 4 de los 5 ensayos mostraron, además, una mejoría en los síntomas gastrointestinales tras el uso de probióticos (Kaluzna-Czaplinska y Blaszczyk, 2012; Parracho *et al.*, 2010; Shaaban *et al.*, 2018; West *et al.*, 2014). Los autores de esta revisión concluyen que son necesarios ensayos clínicos adicionales que controlen los posibles sesgos asociados a las intervenciones nutricionales (De Angellis *et al.*, 2015).

Los suplementos con enzimas digestivos han ganado popularidad en todo el mundo, en parte gracias al *Best seller* publicado en 2014 por el Dr. Hiromi Shinya titulado “*la enzima prodigiosa: una forma de vivir sin enfermar*”. El autor propone una dieta que ayude a prevenir enfermedades crónicas como las cardiopatías, la diabetes, la obesidad y otras patologías como el cáncer. Explica por qué ciertos alimentos considerados saludables como los lácteos participan en la aparición de estas enfermedades. Una prueba del éxito de este libro es que el mercado de suplementos de enzimas digestivos alcanzó en 2015 casi los 700 millones de euros.

La teoría digestivo-inmune del autismo (Knivsberg *et al.*, 1990, 2003; Reichelt *et al.*, 1991 y 2003; Shattock y Whiteley, 2002) ha impulsado a los investigadores a estudiar los efectos de estas enzimas en los síntomas nucleares y periféricos del autismo, aunque hasta el momento el grado de evidencia es insuficiente para recomendar estos suplementos en los TEA. La revisión sistemática de Sathe y colaboradores (2017) incluyó dos ensayos clínicos aleatorizados y controlados con placebo (Munasinghe *et al.*, 2010; Saad *et al.*, 2015;) y solo uno de ellos mostró una mejoría significativa de los síntomas en el grupo de tratamiento respecto al grupo control (Saad *et al.*, 2015).

### 1.3.5. Intervenciones dietéticas

#### *Leche de camella*

El uso de la leche de camella puede tener beneficios terapéuticos en enfermedades tales como las alergias alimentarias, la diabetes mellitus o la hepatitis B, entre otras enfermedades autoinmunes (Gizachew *et al.*, 2014). La causa de estos beneficios parece encontrarse en las propiedades de este tipo de leche, que presenta mayor cantidad de vitaminas y minerales y menor cantidad de lactosa y colesterol que la leche de origen bovino. Además, estos lácteos carecen de beta-lactoglobulina y beta-caseína que son péptidos presentes en la leche de vaca capaces de desencadenar reacciones inmunes digestivas y sistémicas relacionadas con la fisiopatología de diversos trastornos, entre ellos el autismo (Reichelt *et al.*, 1991 y 2012). Por el contrario, la leche de camella contiene

proteínas y enzimas entre las que se encuentran inmunoglobulinas, lactoferrina, lisozimas y lactoperoxidasa, que le confieren a este alimento propiedades antibacterianas, antivirales y un efecto hipoalergénico e inmunológico que se ha relacionado con la mejoría de los síntomas nucleares del autismo (Bashir y Al-Ayadhi, 2014).

### *Dietas cetogénicas*

Bajo el nombre de dieta cetogénica (DC), se designan diferentes modalidades dietéticas atendiendo a la proporción de macronutrientes o al aporte calórico: dietas reducidas en glúcidos y/o hidratos de carbono, dietas con aporte aumentado de grasas y/o proteínas o dietas con bajo aporte calórico.

Las DC entendidas como aquellas que pretenden eliminar el aporte de hidratos de carbono para forzar al organismo a que utilice las grasas como fuente de energía, han demostrado tener una función anti-epileptógena (Hallbook *et al.*, 2015). El uso de estas dietas, además, se ha relacionado con una regulación en la función metabólica/mitocondrial que se encuentra alterada en diversos trastornos del neurodesarrollo, incluidos los TEA (Doenyas, 2018). Una revisión sistemática sobre el uso de DC en autismo (Castro *et al.*, 2015) mostró efectos positivos en los síntomas nucleares (fundamentalmente en los casos leves y moderados), así como en algunos casos de crisis epilépticas y alteraciones de conducta asociadas.

Los mecanismos biológicos subyacentes al efecto de estas dietas han sido estudiados en modelos animales (Mychasiuk y Rho, 2017; Newell *et al.*, 2016; Ruskin *et al.*, 2013), concretamente en las cepas de ratón BTBR T+ Itpr3tf/J que se utilizan en la investigación de los TEA porque exhiben síntomas autísticos (carecen de cuerpo calloso y tienen reducida la comisura del hipocampo). Se han descrito en estos animales cambios en la formación de mielina y en la conectividad de la sustancia blanca tras el uso durante dos semanas de DC. También se ha visto que estas cepas exhiben un perfil en la microbiota intestinal diferente al de los controles y que la DC es capaz de reducir el número total de bacterias en el intestino y equiparar los niveles al de los controles sanos. Los autores interpretan estos resultados sugiriendo que la DC tiene efectos antimicrobianos a nivel intestinal (Newell *et al.*, 2016).

En contraposición con estos efectos positivos, la DC también se ha asociado a un incremento del riesgo inflamatorio intestinal al aumentar las cepas de bacterias *Clostridium* productoras de toxinas, causando síntomas como el estreñimiento y el reflujo gastroesofágico, que son comorbilidades gastrointestinales frecuentes en el autismo.

En resumen, existe una insuficiente evidencia para recomendar el uso de las DC en los TEA y es recomendable estudiar previamente los perfiles metabólicos y bioquímicos de los pacientes para evitar posibles efectos adversos (Napoli *et al.*, 2014).

#### 1.4. DIETAS LIBRES DE GLUTEN Y CASEÍNA (DLGC)

##### 1.4.1. *Introducción*

###### 1.4.1.1. Gluten

El gluten es una glicoproteína presente en diversos tipos de cereales, desde aquellos más comunes como el trigo, la cebada, el centeno y la avena hasta la malta, la escanda, el triticale, la espelta, el farro y el kamut. Conviene aclarar que el término malta o malteado se utiliza para designar un proceso aplicado a los granos de cereal (fundamentalmente la cebada) a partir del cual se elaboran diversos productos como la cerveza. El gluten también se utiliza frecuentemente como aditivo en alimentos procesados para mejorar la textura, la retención de humedad y el sabor (Biesiekierski, 2017).

En general, la sociedad occidental tradicionalmente ha consumido altas cantidades de gluten, entre 5 y 20 gramos al día como promedio (Biesiekierski, 2017). Sin embargo, durante los últimos años ha crecido el interés por los alimentos y productos libres de gluten (Igbinedion *et al.*, 2017), con el consecuente aumento de este mercado (Mogul *et al.*, 2017). En 2015, un estudio mostró que hasta el 20% de la población americana optaba por una dieta libre de gluten (Miller, 2016).

El grano de trigo contiene entre un 8 y un 15% de proteínas, de las cuales un 90% es gluten. El gluten es una compleja mezcla de cientos de proteínas diferentes pero relacionadas entre sí. Las dos más importantes son la gliadina y la gluteína. La gliadina contiene secuencias peptídicas resistentes a la acción proteolítica gastrointestinal que forman residuos de aminoácidos (ricos en prolina) responsables de mediar las reacciones inmunes descritas en la enfermedad celíaca (Hausch *et al.*, 2002). En este punto conviene diferenciar los conceptos de enfermedad celiaca, intolerancia al gluten no celiaca y alergia al trigo.

La enfermedad celiaca es una reacción autoinmune desencadenada por la ingesta de gluten en individuos genéticamente predispuestos. La prevalencia de la enfermedad celíaca ha aumentado durante las últimas décadas. Está considerada una enfermedad global que afecta al 0,7% de la población mundial (Glissen y Singh, 2018). La presentación clínica abarca desde sujetos asintomá-

ticos diagnosticados en grupos de alto riesgo hasta personas que presentan importantes síntomas de malabsorción intestinal (diarrea, esteatorrea, distensión y dolor abdominales, pérdida de peso, etc.) (Ludvigsson *et al.*, 2013), incluso síntomas extra-intestinales cuando se retrasa el diagnóstico (anemia, osteopenia/osteoporosis, neuropatía periférica, etc.) (Hill *et al.*, 2005). Los criterios diagnósticos para la enfermedad celíaca han evolucionado desde el requisito de tres biopsias secuenciales de intestino delgado hasta una combinación de pruebas serológicas positivas específicas para celíacos y la presencia de enteropatía en los resultados histológicos. La mayoría de los sujetos responden a las dietas libres de gluten, que deben mantener de por vida, pero hasta un 20% de ellos presentan síntomas persistentes o recurrentes. La causa más frecuente de estas recidivas son las exposiciones inadvertidas al gluten (Hill *et al.*, 2005).

La intolerancia al gluten no celiaca o síndrome de intolerancia al gluten/trigo es un concepto controvertido que fue descrito a finales de la década de los 70 (Cooper *et al.*, 1980) y que en los últimos años se está estudiando en profundidad. No queda claro si el gluten es el causante de la enfermedad o si, además, participan otros componentes del trigo y de los cereales en general. Las cifras de prevalencia abarcan un rango amplio, desde el 0,6% hasta el 10% de la población. El paciente presenta los síntomas intestinales y/o extra-intestinales propios de la enfermedad celíaca pero sin el patrón serológico e histológico característico (Sapone *et al.*, 2011). Para el diagnóstico, es necesario descartar primero la enfermedad celíaca y la alergia al trigo y se recomienda realizar con el paciente pruebas a doble ciego con dietas libres de gluten y con dietas que contienen esta proteína para evitar los efectos placebo y nocebo, respectivamente (Molina-Infante y Carroccio, 2017). Aún no queda claro si la intolerancia al gluten no celiaca es una enfermedad transitoria o crónica que requiera dietas de restricción de por vida. El énfasis actual de la investigación radica en encontrar biomarcadores específicos que no sean compartidos con los de la enfermedad celíaca para mejorar el diagnóstico y el tratamiento de estos trastornos (Volta *et al.*, 2015).

La alergia al trigo representa otro tipo de reacción adversa inmunológica a las proteínas presentes en el trigo (fundamentalmente la gliadina y la gluteína) y a los cereales relacionados, con diferentes presentaciones clínicas en función de la vía de exposición: aérea (“asma ocupacional del panadero”, rinitis); alergia alimentaria (con afectación en la piel, en el tracto digestivo y/o respiratorio); anafilaxia inducida por el ejercicio; y urticaria de contacto. Los estudios epidemiológicos estiman cifras de prevalencia en niños en torno al 0,4% (Zuidmeer *et al.*, 2008). Las alergias alimentarias, incluida la alergia al trigo, deben ser consideradas en aquellos individuos que presentan una reacción anafiláctica minutos después de haber ingerido un determinado alimento, sobre todo si se

trata de la segunda exposición al alérgeno sospechado (Boyce *et al.*, 2010). El diagnóstico se confirma a través de las pruebas de punción cutánea (Sander *et al.*, 2004). El mejor tratamiento para la alergia al trigo sigue siendo evitar las proteínas implicadas en esta reacción inmunológica. Los tratamientos con inmunoterapia oral constituyen una línea de investigación prometedora en algunas de las alergias alimentarias mediadas por IgE, incluida la alergia al trigo (Pacharn y Vichyanond, 2017).

#### 1.4.1.2. Caseína

La caseína es una fosfoproteína presente en la leche y en algunos de sus derivados como el queso, el requesón, la cuajada, el yogur, el pudín, las natillas, los helados, etc. También forma parte de muchos suplementos alimentarios utilizados en el mundo de la dietética y el deporte (Reyna *et al.*, 2016) y se utiliza como adhesivo en la elaboración de productos alimentarios (derivados lácteos y cárnicos, panes y productos de repostería, etc.).

La caseína representa el 80% de las proteínas de la leche de vaca. Bajo el nombre de caseínas se engloban distintas proteínas con una característica común: precipitan cuando se acidifica la leche a un pH de 4,6. Las caseínas son específicas de cada especie y se clasifican en cuatro grandes grupos atendiendo a sus propiedades electroforéticas:  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína. De todas ellas, la fracción  $\alpha_{s1}$ -caseína es la que tiene mayor capacidad alérgica (Schulmeister *et al.*, 2009).

La alergia a las proteínas de la leche de vaca se define como una reacción inmune mediada por anticuerpos IgE, celular o mixta (Johansson *et al.*, 2004) y tiene una incidencia en la infancia temprana del 2-3% en países desarrollados (Host y Halken, 2014). La mayoría de los niños expresan los síntomas durante el primer mes de vida, a menudo en la primera semana de haber introducido las fórmulas artificiales. Aproximadamente el 50-60% de los casos presentan síntomas gastrointestinales, el 50-70% síntomas cutáneos y hasta un 20-30% presentan síntomas respiratorios. Las reacciones adversas a otros alimentos o alérgenos inhalados se desarrollan hasta en el 50% de los pacientes. El pronóstico generalmente es bueno, con remisiones de los síntomas de hasta el 90% en 3 años. El tratamiento básico de esta enfermedad es eliminar de la dieta las proteínas de la leche de vaca. En la infancia temprana son necesarias leches de sustitución. No deben utilizarse las leches de oveja o de cabra por el alto riesgo de reacciones cruzadas. Las proteínas de soja son tan alérgicas como las de vaca, aunque los niños más mayores pueden tolerarlas (Muraro *et al.*, 2002). Existen recientes modalidades de tratamiento como la inmunoterapia oral, que

consiste en la exposición de cantidades crecientes de alérgenos lácteos para producir una desensibilización, aunque el grado de evidencia es limitado y es un tratamiento asociado a importantes efectos adversos (Taniuchi *et al.*, 2017). El Omalizumab es un anticuerpo monoclonal anti-IgE que puede ser utilizado en monoterapia o en combinación con la inmunoterapia oral (Nadeau *et al.*, 2011).

#### 1.4.2. Evidencia de las DLGC en los TEA

##### 1.4.2.1. Estudios con resultados positivos

La primera evidencia formal de la potencial efectividad de las DLGC en los TEA fue llevada a cabo a principios de los años 90 por un equipo de investigación noruego, encabezado por Knivsberg y Reichelt, quienes realizaron un seguimiento dietético y conductual durante 1 año (Knivsberg *et al.*, 1990) ampliado después a 4 años (Knivsberg *et al.*, 1995) a un grupo de 15 participantes y en el que encontraron tras la DLGC una mejoría (más evidente tras el primer año de seguimiento que tras el cuarto) en algunas conductas autísticas, un descenso de los péptidos urinarios resultantes de la metabolización del gluten y de la caseína, y una disminución del número de crisis epilépticas. Casi al mismo tiempo, Whiteley y Shattock en Reino Unido publicaron resultados similares en las escalas de conducta de un grupo de 22 niños con TEA y trastornos asociados (TEA, n=18; Dispraxia, n=2; Trastorno semántico-pragmático, n=2) que fueron seguidos durante 5 meses con una dieta libre de gluten, aunque en este caso no encontraron disminuciones significativas en los niveles urinarios de los péptidos (Whiteley *et al.*, 1999). Estos trabajos presentan limitaciones importantes, como la metodología no aleatorizada y abierta o la falta de enmascaramiento. En el año 2002, el grupo de Knivsberg y Reichelt trataron de mejorar las deficiencias metodológicas de los estudios anteriores publicando su primer ensayo clínico a simple ciego aleatorizado y controlado con 20 niños diagnosticados de TEA seguidos durante un año, 10 de ellos intervenidos con una DLGC y los 10 restantes con una dieta normal (que contenía gluten y caseína). En el grupo de DLGC se encontraron mejorías significativas en las sub-escalas de comunicación y de interacción social.

Los autores noruegos y británicos se asociaron para publicar en el año 2010 el denominado estudio *ScanBrit*, llamado así por la colaboración conjunta de países escandinavos (Noruega y Dinamarca) y de Gran Bretaña. Se trata de un ensayo clínico a simple ciego aleatorizado de dos años de seguimiento y con un amplio grupo de pacientes (n=72) en el que se ponen de manifiesto efectos



positivos en la conducta y en el desarrollo durante los 12 primeros meses de intervención, seguidos de un efecto meseta en los 12 meses siguientes (Whiteley *et al.*, 2010a). Además, describieron una variabilidad en el grado de respuesta individual a estas intervenciones dietéticas, clasificando a los participantes en respondedores y no respondedores. En concreto, aquellos que presentaban puntuaciones clínicamente significativas en las escalas de hiperactividad e inatención y que tras la dieta presentaron cambios positivos significativos en dichas puntuaciones fueron definidos como respondedores (Pedersen *et al.*, 2014). Por otro lado, la edad fue considerada la variable predictora de respuesta más importante, encontrándose el mayor beneficio a las dietas en el rango de 7 a 9 años. Los investigadores establecieron, además, como uno de los criterios de inclusión que todos los participantes presentaran algún resultado positivo en los péptidos urinarios que se han relacionado con la respuesta a estas dietas (Reichelt *et al.*, 1991). El estudio *Scanbrit* se considera un referente en las DLGC por el amplio tamaño de muestra y por el largo periodo de seguimiento, aunque debido a la ausencia del uso de placebo y a la falta de monitorización de otros tratamientos concomitantes no llega a alcanzar el nivel de evidencia más alto ni el mayor grado de recomendación en las revisiones sistemáticas referentes a este tema (Marí-Bauset *et al.*, 2014).

Además de los trabajos escandinavos y británicos, otros investigadores han publicado resultados favorables en los síntomas nucleares y periféricos del autismo tras la DLGC: comunicación y lenguaje (Adams *et al.*, 2018; El Rashidy *et al.*, 2017; Ghalichi *et al.*, 2016; Knivsberg *et al.*, 1990, 1995 y 2002; Johnson *et al.*, 2011; Lucarelli *et al.*, 1995; Whiteley *et al.*, 1999 y 2010a), interacción social (El Rashidy *et al.*, 2017; Ghalichi *et al.*, 2016; Knivsberg *et al.*, 1990, 1995 y 2002; Lucarelli *et al.*, 1995; Whiteley *et al.*, 1999 y 2010a), conductas estereotipadas (El Rashidy *et al.*, 2017; Ghalichi *et al.*, 2016; Knivsberg *et al.*, 1990 y 1995), coordinación motora (Knivsberg *et al.*, 1990 y 1995), hiperactividad (Johnson *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2014; Whiteley *et al.*, 1999 y 2010a), conductas autolesivas (Knivsberg *et al.*, 1990 y 1995; Lucarelli *et al.*, 1995), disminución de la actividad convulsiva (Knivsberg *et al.*, 1990 y 1995) y síntomas gastrointestinales (Ghalichi *et al.*, 2016).

Existen publicaciones sobre el uso de DLGC con resultados positivos en autismo basadas en informes de casos aislados (Gannage, 2010; Genuis y Bouchard, 2010; Herbert y Buckley, 2013a; Hsu *et al.*, 2009; Irvin, 2006) y en la información aportada por los padres. Pennesi y Klein (2012) realizaron una encuesta a 293 padres de niños con autismo que habían seguido una DLGC y encontraron la mayor respuesta a las dietas en aquellos pacientes con síntomas gastrointestinales y alérgicos, y en aquellos que habían seguido la dieta durante más de 6 meses.



#### 1.4.2.2. Estudios con resultados negativos

Se han publicado ensayos clínicos, especialmente en Estados Unidos y durante los últimos años, que no han mostrado diferencias estadísticamente significativas en los síntomas nucleares y periféricos del autismo tras las DLGC (Elder *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a; Seung *et al.*, 2007).

El primer trabajo con resultados negativos fue publicado en el año 2006 en Norteamérica (Elder *et al.*, 2006). Las dos principales fortalezas respecto al estudio *Scanbrit* son la metodología doble ciego y su diseño cruzado. Estos autores, además, incluyeron videgrabaciones para observar retrospectivamente de un modo más fehaciente los aspectos relacionados con la comunicación verbal y no verbal (Seung *et al.*, 2007). No obstante, este estudio presenta como limitaciones el tamaño de muestra (n=15) y el tiempo de intervención dietética (6 semanas con DLGC y 6 semanas con dieta normal).

Años más tarde, otro grupo estadounidense (Johnson *et al.*, 2011) realizó un ensayo clínico a simple ciego que tampoco encontró diferencias significativas entre el grupo de DLGC y el de dieta normal. Al igual que el trabajo de Elder y colaboradores, la muestra de pacientes (n=22) y el tiempo de seguimiento (12 semanas) fueron muy inferiores a las del estudio *Scanbrit*.

En 2015 se publicaron dos trabajos con resultados negativos. El primero de ellos (Pusponegoro *et al.*, 2015a) fue diseñado para investigar el posible efecto de una suplementación con gluten y caseína durante 7 días en las alteraciones de conducta y en los síntomas gastrointestinales de 74 niños diagnosticados de TEA y con incremento de peptiduria. El segundo estudio publicado ese año (Navarro *et al.*, 2015) es, al igual que el anterior, un ensayo clínico a doble ciego controlado con placebo y diseñado en este caso para estudiar el efecto de una suplementación con gluten y caseína durante 4 semanas en la permeabilidad intestinal y en la conducta de un grupo de 12 pacientes autistas.

En 2016, la Doctora Susan Hyman (Departamento de Pediatría. Universidad de Rochester. Estados Unidos) publicó los resultados de un ensayo clínico a doble ciego aleatorizado y controlado con placebo que estudió la eficacia y seguridad de las DLGC en 14 niños diagnosticados de autismo de entre 3 y 5 años de edad. Los autores justificaron el uso de este estrecho rango de edad basándose en que en los niños pequeños existe más control parental sobre la dieta y un mayor potencial de respuesta a las intervenciones dietéticas y a otros tratamientos (Seroussi, 2002). El estudio constó de tres fases: implementación, intervención y mantenimiento. Durante la fase de implementación, que duró 6 semanas, se instauró la DLGC con un asesoramiento dietético estrecho y personalizado a través de una nutricionista que acudió en dos oca-

siones a cada domicilio para instruir a los padres en cómo llevar a cabo la dieta. Además, durante esta fase se realizaron contactos semanales telefónicos para monitorizar la dieta y seguir con el asesoramiento. La fase de intervención duró 12 semanas y consistió en la administración, una vez por semana, de alimentos preparados en forma de *snacks* que contenían solo gluten, solo caseína, gluten y caseína, o ninguno de los dos (placebo). Los 4 tipos de *snacks* se administraron a cada participante de forma aleatorizada a lo largo de las 12 semanas. Los autores justificaron el uso de intervalos semanales basándose en los datos de las encuestas que reflejan que el 94% de los padres informan de los efectos secundarios del gluten y de la caseína en el plazo de una semana (Pennesi y Klein, 2012) y apoyándose también en estudios de alergias alimentarias (Metcalf y Sampson, 1990). Durante las fases de implementación e intervención se realizaron mediciones semanales del estado nutricional y conductual de los participantes. La fase de mantenimiento duró otras 12 semanas, durante las cuales los padres eran libres de mantener, modificar o abandonar la DLGC. Al final de este periodo se volvieron a realizar mediciones del estado conductual y nutricional. Los resultados mostraron que la DLGC acompañada de un consejo nutricional es segura y bien tolerada pero que, sin embargo, no tiene efectos estadísticamente significativos en los síntomas de autismo y problemas de comportamiento asociados. Además del diseño doble ciego y del rigor metodológico de este estudio, otra fortaleza es que se fijó como criterio de inclusión que los participantes estuvieran estabilizados durante los 4 meses previos con un programa de terapia conductual basada en el método ABA (*Applied Behavior Analysis*) y que no tomaran ningún tratamiento psicofarmacológico ni antes ni durante el estudio. La principal limitación fue el tamaño de muestra (n=14).

Todos los ensayos clínicos de doble ciego en este área de investigación han aportado resultados negativos salvo uno de ellos (Lucarelli *et al.*, 1995) pero que, debido a los fallos metodológicos, no está incluido en las revisiones sistemáticas sobre DLGC (Millward *et al.*, 2008; Piwowarczyk *et al.*, 2018) o bien está considerado un trabajo con escaso nivel de evidencia (2-) (Marí-Bauset *et al.*, 2014). El principal inconveniente de los trabajos a doble ciego en DLGC y autismo es que tienen un pequeño tamaño de muestra y/o un tiempo de seguimiento corto. Esto se debe al alto coste que suponen y a la dificultad inherente a la propia metodología de las intervenciones dietéticas (Foster y Bradley, 2018).

En contraposición, la mayoría de los trabajos con resultados positivos pertenecen al grupo escandinavo y británico que se caracterizan por tener tamaños de muestra y tiempos de seguimiento mayores, pero no utilizan herramientas estandarizadas para monitorizar la adherencia a la dieta ni emplean técnicas de doble ciego (Knivsberg *et al.*, 1990, 1995 y 2002; Whiteley *et al.*, 1999 y 2010a).

El tamaño de muestra mínimo necesario para los trabajos de DLGC en autismo, en general, está fijado en 30. Este cálculo está basado en el trabajo de Knivsberg y colaboradores (2002), que asumiendo un error  $\alpha$  de 0,05 y un error  $\beta$  de 0,90 estimaron una probabilidad de mejora con la DLGC del 60% frente al 10% esperado en el grupo con dieta normal, para una relación 1:1. Los ensayos clínicos que trabajan con umbrales y reasignaciones de grupos, como es el caso del estudio *Scanbrit*, disminuyen las tasas de deserciones, son más flexibles y más cercanos a escenarios de la vida real permitiendo investigar mejor en aquellos trastornos que reclutan pequeños tamaños de muestra (Chow y Chang, 2008).

En general, el tiempo mínimo de intervención para una DLGC está fijado en 3 meses, basándose en que los residuos del gluten y sus bioproductos permanecen activos en el intestino de las personas afectas de enfermedad celíaca hasta 12 semanas después de retirar el gluten de la dieta (Kumar *et al.*, 1979). Pero a partir del estudio *Scanbrit* (Whiteley *et al.*, 2010a) y de otras fuentes basadas en la información aportada por los padres (Pennesi y Klein, 2012) se sugiere que podrían ser necesarias intervenciones más largas, de al menos 6 meses, para encontrar efectos positivos.

La edad cronológica se ha pensado como un posible factor de respuesta (Charman *et al.*, 2015; Whiteley *et al.*, 2010a), observándose más efectos terapéuticos en sujetos más jóvenes. No queda claro si estas diferencias son debidas a factores de plasticidad y maduración cerebral en sujetos más jóvenes o se trata de una pura coincidencia en relación a la inestabilidad diagnóstica que existe en edades más precoces.

#### 1.4.2.3. Otros estudios sobre DLGC

Varios trabajos han investigado el efecto del uso combinado de las DLGC con otras dietas de exclusión y/o suplementos dietéticos. Grimaldi y colaboradores (2018) utilizaron suplementación con prebióticos (galacto-oligosacáridos) durante 6 semanas en un grupo de participantes que ya estaban siguiendo una DLGC (grupo de intervención combinada) y compararon los resultados con otro grupo que solo seguía la DLGC (grupo placebo) y con un tercer grupo que seguía una dieta normal (grupo comparador); Recogieron muestras fecales, de orina y de ADN y encontraron en el grupo de intervención combinada, además de cambios significativos a nivel conductual, determinadas diferencias en el metabolismo y en la composición de la microbiota intestinal. Por su parte, Adams y colaboradores publicaron, también en 2018, otro estudio que incluyó a 117 niños y adultos diagnosticados de TEA. 67 participantes fueron tratados durante 12 meses con una intervención dietética que consistía en una suple-

mentación con vitaminas, minerales, ácidos grasos, enzimas digestivos y en una dieta libre de gluten, caseína y soja. En el grupo de tratamiento hallaron mejorías significativas en las escalas de aptitudes intelectuales no verbales y un incremento de los niveles séricos de ciertos micronutrientes.

Dado que la nutrición juega un importante papel en el neurodesarrollo, también se ha investigado el efecto de las DLGC en otros trastornos diferentes al autismo (Cruchet *et al.*, 2016). En el año 2000, Cade y colaboradores publicaron en la revista *Nutritional Neuroscience* un trabajo titulado “Autismo y esquizofrenia: trastornos intestinales”, con el objeto de confirmar la hipótesis que años anteriores se había formulado sobre neuropéptidos de origen exógeno en estos dos trastornos (Dohan y Graberger, 1973; Reichelt *et al.*, 1986). Estudiaron a 120 sujetos con esquizofrenia y a 150 con autismo. Realizaron determinaciones inmunológicas encontrando niveles de anticuerpos contra la gliadina y la caseína más bajos en un grupo de participantes que se había sometido a un tratamiento de diálisis o de DLGC. También encontraron en este grupo mejorías en los síntomas autísticos y conductuales.

Desde que en 1975 el Dr. Ben Feingold, pediatra y alergólogo estadounidense, desarrollara unas dietas libres de aditivos y salicilatos para el tratamiento de ciertas alergias infantiles y describiera efectos adicionales positivos en el comportamiento de los niños (Kavale y Forness, 1983), las dietas de eliminación se han estudiado ampliamente en el TDAH (Ly *et al.*, 2017; Sonuga-Barke *et al.*, 2013), fundamentalmente las dietas libres de aditivos y las dietas oligoantigénicas. Las DLGC no se han estudiado formalmente en este trastorno hasta la fecha, a pesar de que el TDAH y los TEA son dos trastornos del neurodesarrollo relacionados entre sí y teniendo en cuenta, además, que se han reportado mejorías en los síntomas de hiperactividad asociados al autismo tras las DLGC (Johnson *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2014; Whiteley *et al.*, 1999 y 2010a).

#### 1.4.2.4. Trabajos de revisión

Existen diversos trabajos de revisión y síntesis sobre DLGC en autismo (Dosman *et al.*, 2013; Elder *et al.*, 2015; Knivsberg *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2015; Marí-Bauset *et al.*, 2014; Millward *et al.*, 2008; Mulloy *et al.*, 2010; Piwowarczyk *et al.*, 2018; Whiteley *et al.*, 2010b y 2013; Whiteley, 2015). Todos ellos insisten en la precaución a la hora de adoptar conclusiones universales sobre los efectos que tienen este tipo de intervenciones dietéticas. Algunos autores son más conservadores (Dosman *et al.*, 2013; Lange *et al.*, 2015; Marí-Bauset *et al.*, 2014) y solo recomiendan la dieta tras un diagnóstico de alergia/intolerancia al gluten y/o la caseína.

Hasta el momento no existen meta-análisis disponibles sobre el uso de DLGC en el autismo, debido al riesgo de sesgo (Schünemann *et al.*, 2013) por la heterogeneidad metodológica de los ensayos clínicos incluidos en las revisiones.

En 2008, la biblioteca Cochrane publicó una revisión sistemática sobre DLGC en TEA (Millward *et al.*, 2008) que incluyó sólo dos ensayos clínicos (Elder *et al.*, 2006; Knivsberg *et al.*, 2002) que abarcan un total de 35 niños con TEA. Uno de los ensayos clínicos (Knivsberg *et al.*, 2002) mostró en sus resultados una disminución de los rasgos autistas tras la DLGC mientras que el otro (Elder *et al.*, 2006) no encontró diferencias entre el grupo de intervención y el grupo control. En abril de 2019, la revisión ha sido retirada de la base de datos Cochrane por no haber sido actualizada desde el año 2008 (Millward *et al.*, 2019).

Piwowarczyk y colaboradores (2018) incluyeron 6 ensayos clínicos en su revisión sistemática (Elder *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2011; Knivsberg *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2015; Pusponero *et al.*, 2015a; Whiteley *et al.*, 2010a) que conformaron un total de 214 participantes (107 para cada grupo, experimental y control) con un rango de edades de entre 2 y 16 años. Los diagnósticos de TEA fueron realizados siguiendo los criterios de la cuarta edición del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-4 y DSM-4-TR), empleando la *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) (Rutter *et al.*, 2003) o a través de la *Autism Diagnostic Observation Schedule* (ADOS) (Lord *et al.*, 1989), salvo en uno de los ensayos clínicos donde no se detalló qué criterios diagnósticos se utilizaron (Knivsberg *et al.*, 2002). Los ensayos clínicos seleccionados por los revisores pertenecen todos a países desarrollados e industrializados (Elder *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2011; Knivsberg *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2015; Whiteley *et al.*, 2010a), salvo uno de ellos que procede de Indonesia (Pusponero *et al.*, 2015a).

De los 6 estudios seleccionados por Piwowarczyk y colaboradores, solo dos de ellos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de DLGC y el grupo control (Knivsberg *et al.*, 2002; Whiteley *et al.*, 2010a). A pesar de que los dos estudios pertenecen a investigadores comunes (grupo escandinavo-noruego) y utilizaron herramientas de evaluación bastante similares, los resultados no se replicaron en los mismos dominios ni sub-escalas.

La metodología de los 6 estudios seleccionados es bastante heterogénea. La forma en la que se administró la DLGC varió de unos estudios a otros: a través de nutricionistas que guiaron a los padres en cómo seguir una DLGC y una dieta normal (Johnson *et al.*, 2011; Knivsberg *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2015; Whiteley *et al.*, 2010a); a través de la administración de la dieta en cuestión por parte del propio equipo de investigación (Elder *et al.*, 2006); o utilizando suplementaciones a doble ciego de gluten, caseína o placebo en los pacientes

que ya estaban siguiendo una DLGC (Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a).

El periodo de seguimiento de la dieta de los 6 estudios revisados varió entre 7 días (Pusponegoro *et al.*, 2015a) y 24 meses (Whiteley *et al.*, 2010a). Los 4 estudios que no mostraron resultados positivos tuvieron un tiempo de intervención igual (Johnson *et al.*, 2011) o inferior a 3 meses (Elder *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a). El uso de las escalas para medir el cambio a la dieta también fue heterogéneo entre los 6 estudios, no todos evaluaron los síntomas gastrointestinales (Johnson *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a), los efectos secundarios (Johnson *et al.*, 2011; Whiteley *et al.*, 2010a) ni incluyeron parámetros bioquímicos (Elder *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2011; Knivsberg *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2015; Whiteley *et al.*, 2010a).

Una de las principales limitaciones de la revisión de Piwowarczyk y colaboradores es que no incluye el estudio de Susan Hyman (2016), que como ya se ha referido engloba las características de modalidad doble ciego y de tiempo de seguimiento medio (12 semanas), aunque le penaliza el pequeño tamaño de muestra empleado (n=14). (Ver tabla 1)

#### 1.4.3. Aspectos de riesgo y seguridad derivados del uso de las DLGC

El empleo de las DLGC para el tratamiento del autismo puede comportar ciertos riesgos (Marí-Bauset *et al.*, 2014). Las deficiencias nutricionales que pueden surgir por el uso de estas dietas suponen la principal preocupación (Arnold *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2002), fundamentalmente en lo que se refiere al déficit de calcio tras la exclusión de los productos lácteos (Hediguer *et al.*, 2008; Konstantynowicz *et al.*, 2007) que consecuentemente puede alterar el crecimiento óseo (Monti *et al.*, 2007; Neumeyer *et al.*, 2013).

Existe un continuo debate acerca de si estas deficiencias nutricionales son debidas a las dietas de exclusión, a los problemas del comportamiento alimentario de estos sujetos (restricciones dietéticas, selectividad, etc.) o a ciertas alteraciones en la absorción de nutrientes subyacentes a la condición autista (Herndon *et al.*, 2009).

Varios investigadores pertenecientes al instituto de Salud Carlos III de Madrid (Marí-Bauset *et al.*, 2016) publicaron un estudio en el que se compararon variables antropométricas, de ingesta de nutrientes y de variedad de alimentos en 105 niños con TEA, 20 que seguían una DLGC y 85 que realizaban una dieta regular. En el grupo con DLGC encontraron valores más bajos en el peso, en el índice de masa corporal y en el total de calorías ingeridas, y una ingesta más baja de calcio, fósforo, vitamina B5 y sodio. Sin embargo, en el grupo de dieta



**Tabla 1. Estudios publicados sobre la eficacia de las DLGC en los TEA**

Autor	País	N	Diseño	Seguimiento	Instrumentos de evaluación	Resultados
Knivsberg <i>et al.</i> , 1990	Noruega	15 pacientes TEA No controles 6-14 años	Cohortes DLGC	12 meses	DIPAB, C-RAVEN Información padres/cuidadores Niveles: péptidos en orina	Mejoría conductual Disminución actividad convulsiva Disminución péptidos urinarios
Knivsberg <i>et al.</i> , 1995	Noruega	(Cont. Knivsberg <i>et al.</i> , 1990)	(Cont. Knivsberg <i>et al.</i> , 1990)	(4 años)	(Cont. Knivsberg <i>et al.</i> , 1990)	Mejoría conductual, menos evidente que tras el primer año (Knivsberg <i>et al.</i> , 1990)
Lucarelli <i>et al.</i> , 1995	Italia	36 pacientes TEA 20 controles sanos 8-13 años	Cohortes (1ªfase): DLG D.C.iego(2ªfase): Supl. caseína	1ªFase: 2 meses 2ªFase: 2 semanas	ERC Niveles: Ig en sangre	Mejoría conductual y disminución Ig tras 1ªfase Resultados no concluyentes tras 2ªfase
Whiteley <i>et al.</i> , 1999	Reino Unido	22 pacientes TEA 11 controles TEA 3-8 años	Cohortes Grupo intervención: DLG Controles D. Normal/Reintr. gluten	5 meses	ERC, K-ABC Información padres/cuidadores Niveles: péptidos en orina	Mejoría conductual Disminución (no significativa) de los péptidos urinarios
Knivsberg <i>et al.</i> , 2002	Noruega	10 pacientes TEA 10 controles TEA 5-10 años	Simple ciego aleatorizado Grupo intervención: DLGC Grupo control: dieta normal	12 meses	DIPAB, LIPS, ITPA, Reynell Spraktest, TOMI Información padres/cuidadores	Mejoría conductual en comunicación e interacción Social
Elder <i>et al.</i> , 2006	Estados Unidos	15 pacientes TEA 2-16 años	Cross-over doble ciego aleatorizado: 6 sem DLGC + 6 sem D. Normal No periodo lavado	3 meses	CARS, ECOS Información padres/cuidadores Niveles: péptidos en orina	No diferencias estadísticamente significativas en síntomas conductuales ni péptidos urinarios
Whiteley <i>et al.</i> , 2010	Reino Unido Noruega Dinamarca	38 pacientes TEA 34 controles TEA 4-10 años	Simple ciego aleatorizado Grupo intervención: DLGC Grupo control: dieta normal	24 meses	ADOS, GARS, VABS, ADHD-IV	Mejoría a los 12 meses; Efecto meseta a los 24 meses; Mayor respuesta en hiperactividad y rango de edad 7-9 años (Pedersen <i>et al.</i> , 2014)
Johnson <i>et al.</i> , 2011	Estados Unidos	8 pacientes TEA 14 controles TEA 3-5 años	Simple ciego aleatorizado Grupo intervención: DLGC Controles: D. Baja en azúcar	3 meses	MSEL, CBCL, ADOS Cuestionario de efectos secundarios Recuerdo de 24 horas	No diferencias estadísticamente significativas en síntomas conductuales ni en efectos secundarios
Pusponegoro <i>et al.</i> , 2015	Indonesia	38 pacientes TEA 36 controles TEA 4-6 años	Doble ciego aleatorizado placebo: Suplementación gluten + caseína Vs. Arroz	1 semana	PDDBI, GSSI Niveles: péptidos en orina	No diferencias estadísticamente significativas en síntomas conductuales, gastrointestinales ni péptidos urinarios
Navarro <i>et al.</i> , 2015	Estados Unidos	6 pacientes TEA 6 controles TEA 4-7 años	Doble ciego aleatorizado placebo: Suplementación gluten + leche en polvo Vs. Harina de arroz integral	4 semanas	SCQ, ABC, CBCL, CPRS-R Niveles: permeabilidad intestinal (lactulosa y manitol)	No diferencias estadísticamente significativas en síntomas conductuales ni en niveles de permeabilidad intestinal
Hyman <i>et al.</i> , 2016	Estados Unidos	14 pacientes TEA 3-5 años	Cohortes (1ªfase): DLGC Doble ciego aleatorizado placebo (2ªfase): Supl. Gluten Vs. Caseína Vs. Gluten + Caseína Vs. Placebo Mantenimiento (3ªfase): DLGC	1ªFase: 6 semanas 2ªFase: 3 meses 3ªFase: 3 meses	Conners, Ritvo-Freeman, Diarros de sueño Efectos secundarios	No diferencias estadísticamente significativas en síntomas conductuales, autísticos ni fisiológicos No efectos secundarios
Ghalichi <i>et al.</i> , 2016	Irán	40 pacientes TEA 40 controles TEA 4-16 años	Simple ciego aleatorizado Grupo intervención: DLG Grupo control: dieta normal	6 semanas	GARS, ROME III	Mejoría conductual y en síntomas gastrointestinales
El-Rashidy <i>et al.</i> , 2018	Egipto	15 pacientes TEA 30 controles TEA 3-8 años	Casos y controles; tres grupos: DLGC(n=15), dieta(n=15) cetogénica dieta normal (n=15)	6 meses	CARS, ATEC Recuerdo de 24 horas	Mejoría conductual en grupos DLGC y dieta cetogénica respecto a grupo control

regular se encontró un menor consumo de fibra, legumbres, verduras y grasas de alto valor biológico.

De todos los ensayos clínicos publicados sobre DLGC en autismo, solo unos pocos han incluido variables de riesgo y de seguridad (Elder *et al.*, 2006; El-Rashidy *et al.*, 2017; Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011; Knivsberg *et al.*, 2010a) y ninguno de ellos ha mostrado hasta el momento resultados de efectos adversos. No existe una amplia bibliografía que incluya información antropométrica en las intervenciones con DLGC. Algunos casos estudiados indican una normalización en los patrones de crecimiento tras la utilización de las dietas (Hsu *et al.*, 2009). En general, los estudios de revisión (Piwowarczyk *et al.*, 2018) concluyen que no hay evidencia de que las DLGC acarreen efectos secundarios.

No queda claro si es necesario o no el uso de suplementos nutricionales en los pacientes que siguen dietas de exclusión (Adams *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2019). En cualquier caso, el empleo de estos suplementos requiere llevarse a cabo de una manera cuidadosa, para lograr un adecuado equilibrio homeostático, por lo que los profesionales han de ser cuidadosos con el empleo de estos tratamientos (Cook *et al.*, 1999).

Las intervenciones dietéticas en los TEA han sido muy cuestionadas por el impacto que pueden producir en las rutinas de estos niños y en los patrones selectivos y restringidos alimentarios que existen de por sí en esta población (Cornish, 2002). Por otro lado, las restricciones dietéticas pueden limitar aún más el ámbito de socialización (como las fiestas de cumpleaños, excursiones, etc.) y aumentar la estigmatización. A pesar de estos posibles inconvenientes, los estudios más recientes muestran que hasta un 20% de los niños con TEA en edad preescolar utilizan o han utilizado este tipo de dietas (Rubenstein *et al.*, 2018).

En definitiva, a la hora de introducir una dieta exenta de gluten y caseína en un paciente autista, hay que valorar individualmente el potencial riesgo/beneficio y llevar a cabo una monitorización adecuada del estado nutricional y del entorno del paciente (casa, colegio, etc.), con el fin de atender a los aspectos de riesgo y seguridad.

## 1.5. BETA-CASOMORFINA

### 1.5.1. *Teoría intestino-cerebral del autismo*

Hasta el momento, no existe una teoría universal sobre el mecanismo de acción subyacente a los efectos (o a la ausencia de ellos) que producen las DLGC en la etiopatogenia y sintomatología del autismo. Dada la heterogenei-



dad observada en la presentación clínica de estos trastornos, es probable que coexistan varios modelos de explicación (Whiteley, 2015).

El primer autor que estableció una asociación entre los trastornos psiquiátricos y la ingesta de alimentos que contienen gluten y productos lácteos fue Dohan, sugiriendo que la retirada de estos componentes de la dieta mejoraba los síntomas de la esquizofrenia y su reintroducción los empeoraba (Dohan, 1966; Dohan y Graberger, 1973). Posteriormente, Panksepp (1979) postuló que los trastornos conductuales asociados al autismo eran el resultado de una activación anormal del sistema opioide debido a un exceso de agonistas en el cerebro. Partiendo de estos antecedentes, se empezaron a estudiar formalmente los péptidos procedentes del gluten y de la caseína como sustancias con actividad opioide a nivel del sistema nervioso central capaces de influir en los síntomas nucleares y periféricos del autismo (Knivsberg *et al.*, 1990, 2003; Reichelt *et al.*, 1991 y 2003; Shattock y Whiteley, 2002).

Otro de los mecanismos de acción propuestos en las DLGC y directamente relacionado con la teoría opioide es el de la hiper-permeabilidad intestinal (D'euferia *et al.*, 1996; Boukthir *et al.*, 2010; de Magistris *et al.*, 2010; Fowlie *et al.*, 2018; Navarro *et al.*, 2015; Robertson *et al.*, 2008; Srikantha y Mohajeri, 2019). Esta teoría defiende que existe una inadecuada hidrólisis de las proteínas de la dieta junto a una porosidad anormal en la pared intestinal. De este modo, los péptidos derivados del gluten y de la caseína atravesarían la pared intestinal, llegarían a la circulación general y desde ahí cruzarían la barrera hemato-encefálica, produciendo efectos tóxicos en el sistema nervioso central.

La Microbiota intestinal no solo desempeña un papel fundamental en el metabolismo de los alimentos (Panda *et al.*, 2014), sino también en el desarrollo postnatal y en la maduración de los sistemas endocrino e inmune (Borre *et al.*, 2014). De modo que la disbiosis intestinal, definida como un desequilibrio en las colonias beneficiosas que forman parte de la microbiota, ha sido relacionada con la etiopatogenia de distintos trastornos, especialmente las enfermedades autoinmunes, pero también con ciertos trastornos psiquiátricos en los que participan factores inflamatorios como son las demencias, los trastornos afectivos, la esquizofrenia o el autismo (Mangiola *et al.*, 2016). La microbiota intestinal tiene un papel en el metabolismo de los carbohidratos y concretamente en la actividad de las disacaridasas, que podría explicar algunos casos de intolerancia a la lactosa que a veces están presentes en el autismo (Kushak *et al.*, 2011).

Existen algunos soportes bibliográficos al respecto de todas estas teorías, como la aparición de peptiduria en pacientes autistas (Knivsberg *et al.*, 2002; Jarmolowska *et al.*, 2019; Reichelt *et al.*, 2012; Sacco *et al.*, 2010; Trygstad *et al.*, 1980), la producción de anticuerpos frente a las proteínas de la dieta (Vojdani *et al.*, 2004) o el efecto tras la administración de péptidos derivados de la dieta en

la conducta (Sun y Cade, 1999a) y en las pruebas de neuroimagen (Sun *et al.*, 1999b). Los problemas de hiper-permeabilidad en la pared intestinal aparecen en una proporción que va desde un cuarto a un tercio de los pacientes diagnosticados de TEA y se ha visto que estas cifras pueden reducirse tras la administración de una DLGC (Cummins *et al.*, 1991; de Magistris *et al.*, 2010). Wang y colaboradores (2009) encontraron niveles urinarios aumentados de Indol-3-acrilol glicina, una sustancia química producida por la microbiota intestinal, en aquellos pacientes autistas con patología gastrointestinal crónica asociada. En los últimos años, se han incrementado los ensayos clínicos sobre el uso de prebióticos y probióticos como abordaje terapéutico en el autismo, aunque aún no han alcanzado un nivel de evidencia adecuado para recomendar su uso indiscriminado en todos los pacientes (Liu *et al.*, 2019b y 2019c).

Así pues, el llamado “eje microbiota-intestino-cerebro” constituye en sí mismo una de las principales y más integradoras teorías etiopatogénicas del autismo (Whiteley, 2015), ya que involucra la participación de múltiples sistemas, como el endocrino, metabólico, inmune y neurológico.

No obstante, este modelo explicativo continúa siendo a día de hoy un foco de intenso debate y discusión (Dalton *et al.*, 2014; Van de Sande *et al.*, 2014), fundamentalmente en lo que se refiere a la investigación de los derivados peptídicos (Jarmolowska *et al.*, 2019).

Recientemente se están estableciendo endofenotipos específicos, basándose en combinaciones de síntomas, historia de presentación, presencia de comorbilidad, respuesta a distintas estrategias terapéuticas, etc. (Nordahl *et al.*, 2011; Sacco *et al.*, 2010).

### 1.5.2 Síntomas gastrointestinales en los TEA

La primera descripción formal del autismo, realizada por Leo Kanner en 1943, contiene ya referencias a síntomas gastrointestinales en algunos de los 11 casos que publicó. Asimismo, el Doctor Hans Asperger (1961) cuando describió el síndrome que lleva su nombre lo asoció con la enfermedad celíaca.

Los estudios epidemiológicos muestran que, en general, las personas con TEA presentan más trastornos gastrointestinales que la población general (Sullivan, 1997). Los síntomas más frecuentes son la diarrea, el estreñimiento y el dolor abdominal (McElhanon *et al.*, 2014). Se ha postulado que la causa podría ser la intolerancia a ciertos alimentos como el gluten y la caseína, que produciría síntomas digestivos y extra-digestivos según la teoría intestino-cerebral del autismo (Knivsberg *et al.*, 1990, 2003; Reichelt *et al.*, 1991 y 2003; Shattock y Whiteley, 2002).

En 1971, Goodwin y colaboradores publicaron los resultados de un ensayo clínico cuya intervención consistió en una prueba con carga de gluten tras un periodo de dieta de exclusión. Participaron 15 niños diagnosticados de TEA con sus correspondientes 14 hermanos sanos como controles. Se observó una correlación entre autismo y malabsorción intestinal y entre sensibilidad al gluten y disfunción cognitiva. Este trabajo sentó precedentes para estudios posteriores sobre DLGC (Knivsberg *et al.*, 1990 y 1995).

Los ensayos clínicos sobre DLGC en autismo que incluyen escalas de evaluación de síntomas gastrointestinales (Ghalichi *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a) no han mostrado en sus resultados diferencias significativas tras la dieta, si bien el objetivo fundamental de estos trabajos era estudiar los síntomas nucleares y comportamentales del autismo y no específicamente los digestivos. Sin embargo, cuando otros autores han incluido en sus objetivos estudiar directamente la patología digestiva en las DLGC, han encontrado una reducción de los síntomas gastrointestinales tras la dieta (Ghalichi *et al.*, 2016).

A pesar de la estrecha relación existente entre autismo y enfermedad celíaca, no siempre están presentes los patrones histológicos necesarios para el diagnóstico de esta enfermedad autoinmune (McCarthy y Coleman, 1979). Sin embargo, algunas personas con autismo podrían encuadrarse dentro del diagnóstico de sensibilidad al gluten no celíaca porque presentan los síntomas de la enfermedad celíaca y responden a las dietas de exclusión (Lau *et al.*, 2013). Sería interesante encontrar en estos casos marcadores biológicos específicos para este grupo de pacientes de forma que se pudieran identificar las personas candidatas a seguir una dieta de eliminación (Catassi *et al.*, 2013). Esto sería aplicable no sólo a la patología digestiva secundaria a la ingesta del gluten, sino también a los síntomas gastrointestinales derivados del consumo de lácteos. En este sentido, Afzal y colaboradores (2003) encontraron que el predictor más potente del síntoma de estreñimiento en el autismo era el consumo de leche.

También podría ocurrir que, al menos en parte, los trastornos de conducta descritos en el autismo fueran la forma de expresión de sensaciones de dolor abdominal, más aún teniendo en cuenta las dificultades de reconocimiento emocional y de comunicación inherentes al síndrome autístico (Nygaard, 2010). Pusponegoro y colaboradores (2015) no encontraron una asociación entre la severidad de los trastornos de conducta y la presencia de síntomas gastrointestinales u otros marcadores digestivos, aunque en los pacientes con trastornos conductuales graves hallaron niveles urinarios más elevados de péptidos ligados a los ácidos grasos (como marcador de daño del enterocito). Por otro lado, los patrones de comportamiento alimentario restringidos y selectivos del autismo podrían acarrear desbalances en la cantidad de micro y macronutrien-

tes ingeridos y ocasionar molestias digestivas como dispepsia, reflujo, estreñimiento o diarrea (McElhanon *et al.*, 2014). Un estudio publicado recientemente (Ferguson *et al.*, 2019) muestra en sus resultados una falta de asociación entre la cantidad de determinados micro y macronutrientes ingeridos en la dieta y la presencia de síntomas gastrointestinales.

La tendencia actual es la de considerar que existen grupos específicos de TEA con mayor incidencia de problemas gastrointestinales y de la conducta alimentaria (Kalyva, 2009). Nuestro grupo de investigación (Díaz-Atienza *et al.*, 2012) encontró más alteraciones gastrointestinales y de la conducta alimentaria en un grupo de niños y adolescentes diagnosticados de TEA con respecto a sus hermanos sanos. Concluimos en nuestro trabajo que estas alteraciones podrían estar mediadas por el propio síntoma nuclear del autismo basado en los patrones estereotipados de conducta, por los problemas de psicomotricidad, podrían ser subyacentes a distintas intolerancias alimentarias o bien ser una combinación de todos estos factores (Martins *et al.*, 2008). Otro grupo de investigación de nuestro país perteneciente al Hospital Gregorio Marañón de Madrid (Penzol *et al.*, 2019) acaba de publicar los resultados de un estudio descriptivo retrospectivo con 845 pacientes diagnosticados de TEA, de los cuales casi un tercio presentó al menos un síntoma gastrointestinal. La patología digestiva se correlacionó con la presencia de discapacidad intelectual, trastornos del sueño y trastornos de conducta.

### 1.5.3. Péptidos en orina

El énfasis por encontrar marcadores biológicos que ayuden a describir y a delimitar mejor los distintos trastornos mentales sigue siendo un reto para la psiquiatría actual y es precisamente en los trastornos del neurodesarrollo donde más se ha avanzado durante los últimos años (Loth *et al.*, 2016).

El estudio de los biomarcadores proteicos urinarios como indicador etiopatogénico, terapéutico y pronóstico de los trastornos psiquiátricos fue iniciado por Rimland en 1971, quien analizó los patrones cromatográficos urinarios de 2218 niños con psicosis temprana sin encontrar resultados concluyentes. Durante los años siguientes, se llevaron a cabo estudios similares en esquizofrenia y autismo. La mayoría de los autores encontraron patrones cromatográficos en los sujetos con patología diferentes a los de los controles (Foss *et al.*, 1985; Gilbert *et al.*, 1982; Reichelt *et al.*, 1981; Trygstad *et al.*, 1980), aunque los resultados no se pudieron replicar en todos los trabajos (Gilroy *et al.*, 1990).

El interés por el estudio de las proteínas de la dieta se despertó en el contexto de estos trabajos y a partir de las hipótesis de Dohan (1960) y Panksepp

(1979) sobre el exceso de exorfinas en la esquizofrenia y en el autismo, respectivamente. Fue así como se constituyó la teoría digestivo-inmune de los TEA (Knivsberg *et al.*, 1990, 2003; Reichelt *et al.*, 1991 y 2003; Shattock y Whiteley, 2002), la cual postula que existe una digestión alterada del gluten y de la caseína, junto con un aumento de la permeabilidad intestinal (Boukthir *et al.*, 2010) que permite el paso de péptidos derivados de la dieta (Cieślińska *et al.*, 2012 y 2015) a la circulación general, ocasionando una respuesta inmunitaria digestiva y sistémica y, probablemente, una afectación en el sistema nervioso central que sería la que finalmente repercutiría en los síntomas nucleares y periféricos del autismo (Whiteley y Shattock, 2002).

En el intestino, la beta-caseína es degradada en beta-casomorfina, llamada así por su origen exógeno y su actividad opioide similar a la morfina. Por lo tanto, las beta-casomorfina son capaces de unirse a los receptores opioides del cerebro, así como también a los receptores serotoninérgicos (Cieślińska *et al.*, 2017; Sokolov *et al.*, 2014). Ambos receptores son considerados moduladores de la sinaptogénesis en el neurodesarrollo, de ahí la relación entre la exposición crónica y temprana a estos neuropéptidos y la etiopatogenia de los TEA. La beta-casomorfina también participa en otras reacciones inflamatorias e inmunes fuera del sistema nervioso central, como es el caso de las alergias alimentarias o de la dermatitis atópica (Fiedorowicz *et al.*, 2014; Pal *et al.*, 2015). De este modo, se ha visto que las inyecciones subcutáneas de beta-casomorfina son capaces de generar reacciones pseudoalérgicas locales, incluso en niños sanos (Kurek *et al.*, 1996).

Dentro de los diferentes tipos de beta-casomorfina, la que más interés ha suscitado en este área de investigación ha sido la beta-7-casomorfina, un heptapéptido (Tirosina-Prolina-Fenilalanina-Prolina-Glicina-Prolina-Isoleucina) que procede de la variante genética A1 de la beta-caseína bovina (Kamiński *et al.*, 2007) y que se caracteriza por ser muy resistente a la acción de las proteasas (Henschen *et al.*, 1979). Por lo tanto, el péptido se mantiene intacto en el intestino y es capaz de ocasionar una reacción inflamatoria intestinal mediada por los linfocitos Th2 (Haq *et al.*, 2014) que, a su vez, produciría cambios en la permeabilidad y en la microbiota intestinales causantes de algunos síntomas gastrointestinales descritos en el autismo (Lázaro *et al.*, 2016). La beta-casomorfina también se forma a partir de la leche materna pero, en este caso, tiene menor potencial tóxico que la de origen bovino, por lo que los niños alimentados con lactancia materna podrían tener menos riesgo de alteraciones del neurodesarrollo que aquellos alimentados con lactancia artificial (Kost *et al.*, 2009).

La beta-casomorfina, por lo tanto, podría ser utilizada como un indicador indirecto de la ingesta y de la digestión alterada de los productos lácteos (Reichelt *et al.*, 2012). Algunos autores que han encontrado peptiduria en orinas de

niños con TEA han detectado una reducción de dichos péptidos tras la DLGC (Knivsberg *et al.*, 1990 y 1995). Otros autores no han encontrado diferencias significativas en las concentraciones de estos péptidos al comparar la dieta normal con la DLGC (Elder *et al.*, 2006; Pusponegoro *et al.*, 2015a). Los niveles de beta-casomorfina parecen no depender exclusivamente de la ingesta de su precursor, la caseína presente en la leche, lo que sugiere la participación de otros mecanismos moleculares subyacentes (Jarmolowska *et al.*, 2019). Se ha descrito un aumento de las concentraciones en sangre (Jarmolowska *et al.*, 2019; Leboyer *et al.*, 1993; Sokolov *et al.*, 2014) y orina (Reichelt y Knivsberg, 2003; Sokolov *et al.*, 2014; Tveiten *et al.*, 2014) de beta-7-casomorfina superiores en sujetos diagnosticados de TEA respecto a los controles, aunque no todos los trabajos han hallado estos resultados (Cass *et al.*, 2008; Dettmer *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2003).

Las condiciones instrumentales empleadas para la determinación de la peptiduria pueden influir significativamente en la interpretación de los resultados. Los estudios anteriores al año 2000 utilizaban técnicas cromatográficas para la detección de estos biopéptidos (Foss *et al.*, 1985; Gilberg *et al.*, 1982; Israngkun *et al.*, 1986; Reichelt *et al.*, 1981; Trygstad *et al.*, 1980; Whiteley *et al.*, 1999). Estas técnicas presentan limitaciones importantes dada su inespecificidad, ya que son métodos de separación de sustancias que nos indican que hay una determinada molécula con unas características físico-químicas determinadas, pero no permiten identificar la sustancia en cuestión. Por ejemplo, una técnica cromatográfica podría no distinguir la beta-7-casomorfina de origen bovino natural de la sintética o de la de origen humano (leche materna) (Kost *et al.*, 2009). Por el contrario, las técnicas modernas proteómicas que combinan métodos cromatográficos y espectrométricos son más apropiadas para la identificación de sustancias concretas y han sido utilizadas en estudios posteriores para tratar de identificar la beta-7-casomorfina (Cass *et al.*, 2008; Dettmer *et al.*, 2007, Reichelt *et al.*, 2012). Además, parece que estas exorfinas se degradan rápidamente en las muestras de orina (en cuestión de minutos), por lo que es necesario el uso de determinados procedimientos como la congelación precoz, el uso de ácido acético o la agregación de inhibidores de las peptidasas a los tubos de ensayo (Tveiten *et al.*, 2014).

En el año 2014, la Doctora Ayala presentó su tesis doctoral (Universidad Complutense, Madrid) titulada “Detección de beta-7-casomorfina en orina de niños con autismo”. En ella, muestra los resultados de un estudio transversal de casos y controles. Se evaluaron 27 sujetos con TEA y patología digestiva funcional y 26 controles, pareados por sexo y edad, de entre 3 y 17 años. Antes de realizar la determinación de beta-7-casomorfina en orina se realizó una primera fase para la puesta a punto de la técnica utilizando primero muestras de disolución acuosa y después muestras de orina patrón y se emplearon métodos

combinados de cromatografía y espectrometría, consiguiendo así la identificación significativa de la beta-7-casomorfina con una sensibilidad de 0,1 ng/ml. El análisis urinario de los casos y controles se realizó en una segunda (muestra preliminar) y tercera (muestra total) fases. En la muestra preliminar (n=14) se detectó la beta-7-casomorfina en el 90% (9 de 10) de los casos y en el 25% (1 de 4) de los controles, obteniendo así diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Sin embargo, los resultados no pudieron replicarse en la muestra total, lo cual se atribuyó a diversas causas metodológicas (características físico-químicas de las muestras, reproducibilidad de la técnica, proceso de almacenamiento-congelación, etc.).

La aportación fundamental del trabajo de la Doctora Ayala fue el desarrollo de una técnica de detección de beta-7-casomorfina con una sensibilidad muy superior a las empleadas en los estudios precedentes (Cass *et al.*, 2008; Dettmer *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2003), reabriendo así una puerta a la investigación de los péptidos urinarios en el autismo, especialmente en el subgrupo de pacientes que presentan patología digestiva asociada.

Durante los últimos años, un grupo de investigación polaco encabezado por Cieślińska, Fiedorowicz y Jarmolowska ha sido quien más ha estudiado el papel de la beta-7-casomorfina en el autismo. Estos investigadores han utilizado marcadores indirectos de la actividad de estos péptidos, como la enzima dipeptidil-peptidasa-IV (DPPIV) y los receptores opioides  $\nu$  del cerebro.

La enzima DPPIV se encuentra en las células de cepillo del intestino y se encarga de la degradación de la beta-7-casomorfina en el medio extravascular. Esta enzima se encuentra también en la superficie de los linfocitos donde desempeña funciones relacionadas con el sistema inmune (Erić-Nikolić *et al.*, 2011). Se ha sugerido que la actividad de esta enzima podría estar disminuida o alterada en los casos de TEA, aumentando así las concentraciones de péptidos opioides (Cieślińska *et al.*, 2017; Reichelt *et al.*, 1991).

Se ha demostrado que algunas proteínas procedentes de los alimentos tienen la capacidad de ligarse a los receptores opioides del sistema nervioso central (Teschmacher, 2003). En cuanto a la beta-7-casomorfina, es el extremo N-terminal Tirosina-Prolina-Fenilalanina el que le confiere su actividad opioide.

En 2015, Cieślińska y colaboradores publicaron el primer estudio hasta esa fecha sobre el efecto de la beta-7-casomorfina en la expresión de ciertos genes relacionados con la DPPIV y con los receptores opioides  $\nu$ . Además, estudiaron la frecuencia de polimorfismos para estos genes en niños autistas y en controles sanos. Encontraron que ciertos polimorfismos eran más vulnerables a la acción perniciosa de la beta-7-casomorfina, de modo que este péptido provocaría la disminución de la expresión de los genes de la DPPIV, lo que se traduciría en una actividad menor de la enzima y un mayor acúmulo de péptidos bioactivos.



Sin embargo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes relacionados con la síntesis de receptores opioides u entre los casos y los controles. Este estudio abrió una línea de investigación para que otros autores siguieran avanzando en el conocimiento de los efectos epigénéticos que los biopéptidos activos tienen en el desarrollo de ciertas enfermedades como, además del autismo (Cieślińska *et al.*, 2019), los trastornos gastrointestinales (Trivedi *et al.*, 2015), la diabetes tipo I (Lacroix y Li-Chan, 2014) o el síndrome de muerte súbita infantil (Sun *et al.*, 2003), entre otros.

En enero de 2019, el grupo polaco publicó los resultados de otro estudio sobre la influencia de la beta-7-casomorfina en la actividad de la DPPIV en 86 niños diagnosticados de TEA y 51 controles. Se realizaron mediciones de las concentraciones de beta-7-casomorfina en sangre y en orina, de la actividad enzimática de la DPPIV en sangre y se estudió el efecto de la leche bovina hidrolizada, como fuente de exorfinas, en la expresión génica de la DPPIV en las células mononucleares de sangre periférica. Determinaron que las concentraciones en sangre de beta-7-casomorfina y de DPPIV eran significativamente superiores en los casos respecto a los controles pero no encontraron diferencias en cuanto a la actividad enzimática ni en cuanto a la expresión génica de la DPPIV.

A modo de conclusión, podemos afirmar que el conocimiento de los biopéptidos activos como marcadores etiopatogénicos y terapéuticos en los TEA ha ido progresando durante las últimas décadas, ya que se han desarrollado paulatinamente técnicas de detección más precisas y se han empezado a estudiar otros biomarcadores relacionados con estas proteínas. Actualmente, el énfasis está puesto en la detección de los péptidos a través de métodos proteómicos y en la expresión de genes relacionados con enzimas y receptores vinculados al sistema opiáceo (Jarmolowska *et al.*, 2019).



## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

El autor de la presente Tesis Doctoral se ha amparado en el Artículo 18º del texto refundido de las Normas Reguladoras de las Enseñanzas Oficiales de Doctorado y del Título de Doctor por la Universidad de Granada (aprobadas en Consejo de Gobierno de 2 de Mayo de 2012 y modificadas en Consejo de Gobierno de 30 de Octubre de 2013) que determina lo siguiente: “La tesis doctoral consistirá en un trabajo original de investigación elaborado por el candidato en cualquier campo del conocimiento que se enmarcará en alguna de las líneas de investigación del Programa del Doctorado en el que está matriculado”. En concreto, el doctorando ha optado por realizar un trabajo de investigación sobre el efecto terapéutico de las dietas libres de gluten y caseína (DLGC) en el autismo.

Las DLGC como enfoque etiopatogénico y terapéutico en los TEA ha sido objeto de interés y controversia en la investigación. Algunos autores han publicado efectos favorables en los síntomas nucleares y periféricos del autismo tras la DLGC pero otros trabajos, especialmente los más recientes, no han hallado resultados concluyentes. Los artículos de revisión en torno a este tema señalan una falta de evidencia para apoyar el uso indiscriminado de estas intervenciones dietéticas: a) no existe un único modelo explicativo que relacione la fisiopatología del autismo con el efecto de estas dietas (Reichelt *et al.*, 2012); b) las características metodológicas de los ensayos clínicos disponibles en la literatura sobre DLGC son muy heterogéneas en cuanto al tamaño de muestra, el tiempo de seguimiento de la DLGC, los instrumentos de evaluación utilizados, la forma de realizar la intervención dietética, etc. (Piwowarczyk *et al.*, 2018); c) no se conocen características bien definidas que distingan a los respondedores de los no respondedores a las dietas (Whiteley *et al.*, 2013); d) no se ha logrado establecer un consenso claro sobre los efectos terapéuticos alcanzados (síntomas nucleares y periféricos, comorbilidad gastrointestinal, epiléptica o celíaca, diferencias de respuesta según edad o sexo, etc.) (Sathe *et al.*, 2017); y e) no existen guías protocolizadas sobre aspectos de riesgo y seguridad derivados del uso de estas dietas (Marí-Bauset *et al.*, 2014).

La beta-casomorfina es un péptido de origen exógeno que se forma en el intestino por una digestión alterada de la proteína de la leche de vaca (caseína). Se ha postulado que en los TEA existe una porosidad anormal en la barrera intestinal (Boukthir *et al.*, 2010), de modo que la beta-casomorfina, llamada así por su actividad opioide similar a la morfina, atravesaría la barrera intestinal, llegaría a la circulación general y desde allí alcanzaría el sistema nervioso central produciendo un efecto tóxico (Whiteley y Shattock, 2002). Algunos autores que han encontrado peptiduria en orinas de niños con TEA han detectado una reducción de dichos péptidos tras la DLGC (Knivsberg *et al.*, 1990 y 1995).

El objetivo fundamental de esta investigación ha sido doble: 1) determinar si las DLGC disminuyen los trastornos del comportamiento de niños y adolescentes diagnosticados de TEA y 2) examinar si existe una asociación entre los posibles cambios conductuales tras la DLGC y los niveles urinarios de beta-casomorfina.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si responden mejor a las DLGC aquellos participantes con antecedentes de trastornos gastrointestinales y/o del comportamiento alimentario.
2. Delimitar otros subtipos clínicos de TEA en los que, bien por su perfil clínico-conductual, dietético-nutricional o bioquímico, se pueda esperar una mejor respuesta terapéutica a las DLGC.
3. Estimar la eficacia y seguridad de estas intervenciones dietéticas, con el fin de elaborar un protocolo de alimentación que sea aplicable, seguro, eficaz y evaluable para el tratamiento de las alteraciones conductuales que acompañan a los TEA.

Nuestra investigación se desarrolló por medio de dos estudios. Primero se llevó a cabo un ensayo clínico piloto en el que participaron 28 niños y adolescentes diagnosticados de TEA intervenidos durante tres meses con una DLGC. La bibliografía referente a este tema (Pennesi y Klein, 2012; Whiteley *et al.*, 2010a) nos llevó a pensar que para sostener con más firmeza nuestra hipótesis de trabajo necesitábamos aumentar el periodo de intervención con DLGC a seis meses, por lo que se puso en marcha un segundo estudio que fue becado por la Asociación Española de Psiquiatría del Niño y el Adolescente (AEPNyA), en el que participaron 37 niños y adolescentes diagnosticados de TEA que siguieron un régimen de DLGC durante seis meses y en el que se estudiaron variables de eficacia, riesgo y seguridad derivadas del uso de estas dietas y se incluyeron marcadores clínicos de comorbilidad gastrointestinal y de trastornos de la conducta alimentaria (Díaz-Atienza *et al.*, 2012).

### 3. SUJETOS Y MÉTODO

---

#### 3.1. INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN SANITARIA Y FUENTES DE FINANCIACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN

Para poder realizar estos estudios, previamente se contó con el Informe favorable del Comité de Ética de la Investigación de Centro de Granada (anexo 1).

El segundo estudio fue becado por la Asociación Española de Psiquiatría del Niño y el Adolescente (AEPNyA) (anexo 2).

#### 3.2. DISEÑO DE LOS ESTUDIOS Y FLUJO DE PARTICIPANTES

Se llevaron a cabo dos estudios de similares características pero con diferentes periodos de seguimiento, realizados en distintos momentos del tiempo y con muestras diferentes. Primero se realizó un estudio a 3 + 3 meses de seguimiento y años más tarde se replicó la metodología con un segundo estudio ampliando el tiempo de seguimiento a 6 + 6 meses. El tipo de diseño escogido para ambos estudios fue un ensayo clínico cruzado aleatorizado a simple ciego. Esta metodología ha sido utilizada en otros trabajos sobre DLGC en TEA (Elder *et al.*, 2006; Seung *et al.*, 2007) y su principal ventaja es que cada participante se comporta, a la vez, como caso y como control, reduciendo así la variabilidad inter-sujetos y permitiendo trabajar con tamaños de muestra más reducidos, dadas las dificultades en el reclutamiento de pacientes para este tipo de estudios (Marí-Bauset *et al.*, 2014). El periodo total de seguimiento se dividió en dos fases de la misma duración cada una (tres meses para el primer estudio y seis meses para el segundo). Cada participante recibió durante una fase del estudio una dieta que contenía gluten y caseína (en adelante, dieta normal) y durante la otra fase una DLGC. Los sujetos fueron seleccionados desde las consultas de salud mental infanto-juvenil, centros de atención integral temprana y asociaciones de padres de niños autistas de las provincias de Jaén, Granada, Málaga

y Almería, tras haber llevado a cabo una tarea de difusión de la información (verbal y escrita) en los dispositivos mencionados. Los pacientes fueron admitidos consecutivamente a los estudios después de informar a los padres sobre el procedimiento y obtener de ellos el oportuno consentimiento informado (anexo 3). Antes de comenzar cada estudio, se administró a los padres una guía de implementación de la DLGC (anexo 4) con toda la información necesaria que incluía un listado de alimentos, medicamentos y aditivos permitidos y prohibidos, ejemplos de menús semanales e información adicional como puntos de venta o páginas web oficiales sobre productos libres de gluten y caseína. Las familias no fueron compensadas económicamente para evitar posibles conflictos de interés. La guía fue elaborada con la colaboración de las unidades de nutrición clínica y dietética de los Hospitales Universitarios Virgen de las Nieves (primer estudio) y San Cecilio (segundo estudio) de Granada. El orden de intervención (empezar con dieta normal o DLGC) fue asignado aleatoriamente usando un programa informático. De este modo, la muestra de cada estudio quedó dividida en dos grupos: grupo A que empezó con dieta normal y terminó con DLGC y grupo B que, inversamente, empezó con DLGC y terminó con dieta normal. Los sujetos fueron evaluados en tres ocasiones: al inicio de cada estudio, después de la primera intervención dietética y después de la segunda. Los evaluadores desconocían el tipo de intervención que había recibido el participante (diseño simple ciego). No se incluyó periodo de lavado para ninguno de los dos estudios, ya que cada evaluación es realizada meses después de finalizar la intervención anterior sin que, a priori, puedan existir efectos residuales (Kumar *et al.*, 1979).

### 3.3. TAMAÑO DE LAS MUESTRAS

Para ambos estudios, el tamaño muestral que se consideró necesario, asumiendo un error  $\alpha$  de 0,05, un error  $\beta$  de 0,90 y una probabilidad de mejora con la DLGC del 60% (Knivsberg *et al.*, 2002) frente al 10% esperado en el grupo con dieta normal (para una relación 1:1) fue de 30 participantes. El número total de sujetos, estimando las pérdidas a lo largo de cada estudio en un 20%, fue fijado en 40.

### 3.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

El primer criterio de inclusión establecido fue estar diagnosticado de TEA. Los criterios diagnósticos utilizados fueron los propuestos por la Clasificación Internacional de Enfermedades en su décima edición (CIE-10; Organización Mun-

dial de la Salud, 1992). El diagnóstico fue realizado por clínicos con amplia experiencia en autismo. Se fijó un rango de edad de entre 2 y 18 años al inicio de cada estudio como segundo criterio de inclusión.

### 3.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se establecieron los siguientes criterios de exclusión: pacientes que no cumplieran los criterios diagnósticos de TEA de la CIE-10; pacientes diagnosticados de alergia al gluten y/o a la caseína, los cuales no podrían seguir la fase de dieta normal; pacientes que previsiblemente no pudieran seguir adecuadamente la dieta, por ejemplo, niños de padres institucionalizados o diagnosticados de trastorno mental grave; los pacientes que se encontraban tomando medicación psicofarmacológica para controlar síntomas conductuales fueron incluidos en los estudios pero, en estos casos, se llevó a cabo un seguimiento de dicho tratamiento (tipo de medicación, dosis, indicaciones, etc.).

### 3.6. VARIABLES E INSTRUMENTOS DE EVALUACIÓN

Cada sujeto fue evaluado en tres momentos a lo largo de cada estudio:

- *Tiempo 0*: antes de realizar cualquier intervención dietética.
- *Tiempo 1*: al finalizar la primera intervención dietética (tras la dieta normal en el grupo A y tras la DLGC en el grupo B).
- *Tiempo 2*: al finalizar la segunda intervención dietética (tras la DLGC en el grupo A y tras la dieta normal en el grupo B).

En cada evaluación se cumplimentaron varios cuestionarios de conducta, se llevó a cabo un protocolo de adherencia a la dieta, se determinaron los niveles de beta-casomorfinina en orina, se estudiaron parámetros de riesgo y seguridad derivados del uso de estas dietas y se recopiló información sobre antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario. A continuación se describen las variables e instrumentos de evaluación.

#### *Cuestionarios de conducta*

- Cada participante (acompañado por sus padres) fue evaluado por un miembro del equipo investigador, que fue el mismo en las tres evaluaciones y con amplia experiencia en TEA. Se emplearon los siguientes instrumentos de evaluación:

- *Escala ATEC (Autism Treatment Evaluation Checklist*, en inglés, o Escala de Evaluación de Tratamiento en el Autismo; Rimland y Edelson, 1999). Es la más específica de las escalas empleadas en nuestra investigación para medir cambios asociados al tratamiento del autismo y ha sido empleada anteriormente en otros estudios sobre intervenciones nutricionales en TEA (Adams *et al.*, 2018; El-Rashidy *et al.*, 2018; Grimaldi *et al.*, 2018). La versión que hemos utilizado fue traducida y adaptada al castellano por nuestro equipo de investigación (anexo 5) y está disponible on-line (<https://www.scribd.com/document/383541638/ATEC-Adaptacion>) Está compuesta por 4 sub-escalas: 1) habla, lenguaje y comunicación (14 ítems); 2) sociabilidad (18 ítems); 3) conciencia sensorial y cognitiva (18 ítems); y 4) salud física y comportamiento (25 ítems). Cada ítem puntúa de 0 a 2 en las tres primeras sub-escalas y de 0 a 3 en la última. A mayor puntuación, mayor severidad del síntoma o trastorno evaluado. La puntuación total de la escala oscila entre 0 y 175.
  
- *Escala ERC-III (Evaluation Résumé du Comportement*, en francés, o Evaluación Resumida del Comportamiento; Barthélémy *et al.*, 1990). Esta herramienta ha experimentado diversas modificaciones desde que fue diseñada inicialmente en 1986 y ha sido utilizada para identificar síntomas de autismo en otros estudios internacionales (Le Menn-Tripi *et al.*, 2019; Maestro *et al.*, 1999; Oneal *et al.*, 2006), y es especialmente útil para valorar el cambio a los tratamientos (Barthélémy *et al.*, 1997), incluyendo las intervenciones con DLGC (Lucarelli *et al.*, 1995; Whiteley *et al.*, 1999). La versión que hemos escogido fue la que validó y adaptó del francés al castellano el Doctor Joaquín Díaz Atienza (Especialista en Psiquiatría del Niño y del Adolescente, Université Paris VI). Nuestro cuestionario (anexo 6) está formado por 20 ítems, que conforman 7 sub-escalas: 1) repliegue autístico (4 ítems); 2) alteraciones de la comunicación verbal y no verbal (3 ítems); 3) reacciones extrañas al entorno (3 ítems); 4) alteraciones de la motilidad (3 ítems); 5) reacciones afectivas inadecuadas (4 ítems); 6) alteración de las grandes funciones instintivas (1 ítem); y 7) alteración de la atención, percepción y de las funciones intelectuales (2 ítems). Cada ítem tiene una puntuación que varía entre 0 (ausencia del síntoma) y 4 (muy presente). La puntuación total de la escala oscila entre 0 y 80.
  
- *Escala ABC (Aberrant Behavior Checklist*, en inglés, o Escala de Conducta Aberrante; Aman y Singh, 1986) (anexo 7). Esta escala fue inicialmente diseñada para valorar los efectos de la medicación u otros tratamientos

en las personas con discapacidad intelectual (Aman *et al.*, 1985), para estudiar sus alteraciones psicopatológicas y de conducta y ha sido empleada en otros estudios con propósitos similares al nuestro (Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a). Está compuesta por 58 ítems, de los que se derivan 5 dimensiones: 1) irritabilidad, agitación, llanto (15 ítems); 2) letargia, abandono social (16 ítems); 3) conductas estereotipadas (7 ítems); 4) hiperactividad, desobediencia (16 ítems); y 5) locuacidad excesiva (4 ítems). Cada ítem se valora con una puntuación que va desde 0 (no presenta problema) hasta 3 (problema importante). La puntuación total de la escala oscila entre 0 y 174.

### *Protocolo de adherencia a la dieta*

- *Cuestionario de Frecuencia de alimentos FFQ (Food Frequency Questionnaire)* (anexo 8). Este cuestionario fue utilizado en el primer estudio para evaluar el tipo de alimentos consumidos y el grado de adherencia con los requerimientos dietéticos, esto es, excluir gluten y caseína durante la fase de DLGC e incluir estos componentes de la dieta durante la fase de dieta normal. Fue diseñado por el equipo de investigación con la ayuda de la unidad de nutrición clínica y dietética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada). Las preguntas van referidas a la ingesta de alimentos durante los tres meses previos. El cuestionario fue administrado por un miembro del equipo investigador que condujo las entrevistas con los padres en los tres momentos de evaluación: al iniciar el estudio (tiempo 0), a los tres meses (tiempo 1) y a los seis meses (tiempo 2). El cuestionario consta de 120 ítems distribuidos en 9 categorías: 1) productos lácteos (17 ítems); 2) huevos, carne y pescado (26 ítems); 3) verduras y hortalizas (12 ítems); 4) frutas (16 ítems); 5) legumbres y cereales (10 ítems); 6) aceites y grasas (7 ítems); 7) productos de pastelería (9 ítems); 8) bebidas (14 ítems); y 9) miscelánea (9 ítems). Cada ítem puntúa desde 0 (nunca lo ha consumido) hasta 4 (lo ha consumido todos los días). La puntuación total de la escala oscila entre 0 y 480.
- *Recuerdo de 24 horas* (anexo 9). Este instrumento fue empleado en el segundo estudio y permite medir la adherencia a las dos modalidades dietéticas (dieta normal y DLGC). Es una de las técnicas más utilizadas, por su sencillez; y es un modelo que ha sido previamente empleado en otros estudios internacionales para el mismo propósito de control de seguimiento de las DLGC en los TEA (Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011;

Navarro *et al.*, 2015). Consiste en recordar y anotar todos los alimentos y bebidas consumidos en las últimas 24 horas. Tanto en la fase de dieta normal como en la de DLGC, los padres de los participantes cumplimentaron dos cuestionarios por semana. Tras cada intervención dietética se analizaron los resultados del recuerdo de 24 horas y se clasificaron a los participantes en tres grupos: buenos cumplidores (cumplimiento del 80-100% de la dieta según los resultados del recuerdo de 24 horas), regulares cumplidores (cumplimiento del 50-79%) y malos cumplidores (cumplimiento menor del 50%).

#### *Niveles urinarios de beta-casomorfin*

— Se recogió una muestra de orina de cada participante en cada uno de los tres tiempos de evaluación para determinar las concentraciones urinarias de beta-casomorfin. La orina fue recogida a primera hora de la mañana en ayunas. Posteriormente, las muestras fueron congeladas a – 80 grados Celsius y enviadas a un laboratorio externo (Laboratorio Echevarne de Barcelona para el primer estudio y Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada para el segundo estudio) para su análisis, asegurando el mantenimiento de la cadena de frío. En el primer estudio, la técnica instrumental empleada para la determinación de beta-casomorfin fue la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección fotométrica de diodos (PDA). El equipo utilizado fue: Waters 2695 Separations Module equipado con horno de columna y refrigeración de muestras. Detector 2996 Photodiode Array (PDA). En el segundo estudio se utilizaron técnicas combinadas de espectrometría y cromatografía. El equipo utilizado para la detección cromatográfica fue: Waters ACQUITY QSM; Columna WATERS UPLC BEH C18 1.7um de 2.1 x 50 mm. El equipo utilizado para la detección espectrométrica fue: WATERS XEVO-TQS.

#### *Parámetros de riesgo y seguridad*

— *Autoinmunidad.* En la primera evaluación se realizó un protocolo de *screening* para el diagnóstico de Enfermedad Celíaca y/o de alergia a la caseína. Para el caso del gluten, primero se determinaron los niveles totales de Inmunoglobulinas tipo A (IgA) y de anticuerpos Anti-Transglutaminasa (Anti-TG) tipo IgA. En los casos de déficit de IgA, se determinaron los



niveles de Anti-TG tipo IgG. En caso de ser normales los anticuerpos Anti-TG, se determinaron primero los niveles de anticuerpos Anti-Endomisio y, en última instancia, de anticuerpos Anti-Gliadina. Para el caso de la caseína, se realizaron determinaciones de IgE total y de IgE específica frente a la caseína. Cualquier resultado positivo durante este protocolo de autoinmunidad determinó la salida del participante del estudio y la derivación al especialista en digestivo.

- *Hemograma y bioquímica.* Además de realizar una bioquímica estándar, en cada evaluación se determinaron los siguientes parámetros para valorar el estado nutricional del participante y obtener información de seguridad sobre el uso de estas dietas: Calcio, Ferritina, Vitamina D, Ácido Fólico, Hematocrito y Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, del inglés *Insuline-like Growth Factor*).
- *Seguimiento pondero-estatural.* Junto con los parámetros bioquímicos, en cada evaluación los participantes fueron medidos y pesados, para hacer un seguimiento de estas variables a lo largo de cada estudio, con el fin de evaluar aspectos de seguridad derivados del uso de estas dietas.

#### *Antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario*

- *Encuesta de antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario* (anexo 10). Es un cuestionario diseñado por nuestro equipo de investigación y utilizado con anterioridad en otro trabajo (Díaz-Atienza *et al.*, 2012). Fue cumplimentado por los padres de los participantes al inicio del segundo estudio. Evalúa, por un lado, la presencia o ausencia de 6 antecedentes de trastornos gastrointestinales: 1) alergias alimentarias; 2) dolor/cólico abdominal; 3) vómitos; 4) diarreas; 5) estreñimiento; y 6) meteorismo. Por otro lado, evalúa la presencia o ausencia de 13 alteraciones del comportamiento alimentario: 1) dificultad para incorporar alimentos sólidos; 2) alimentación limitada a leche y otros líquidos entre los 12 y 15 meses de edad; 3) no usar cuchara a los 15 meses; 4) usar biberón a los 15 meses; 5) dificultad para incorporar alimentos nuevos; 6) dificultades previas en la masticación; 7) dificultades actuales en la masticación; 8) restricción alimentaria a 3-4 comidas; 9) regurgitación frecuente de alimentos; 10) comer muy despacio; 11) incapacidad para absorber con pajita; 12) alimentación actual triturada o en puré; y 13) conductas de pica.

### 3.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Para el análisis, se han utilizado pruebas paramétricas y no paramétricas según fuera lo apropiado, teniendo en cuenta el tamaño de las muestras y la forma de distribución de las variables. Se comenzó por un estudio descriptivo de los participantes al inicio de cada estudio.

Para las variables continuas (puntuaciones de los cuestionarios y valores de beta-casomorfina en cada uno de los tres tiempos de evaluación) se calculó la media y la desviación estándar. Al estudiar la asociación entre dos variables cuantitativas, se emplearon correlaciones bivariadas (correlación  $r$  de Pearson o  $r_s$  de Spearman, según lo oportuno).

Se analizó el efecto del grupo (A o B) y del tiempo (T0, T1 o T2) por medio de un ANOVA de medidas repetidas a través del test de Friedman para comparaciones múltiples apareadas y no paramétricas. En este punto, cuando se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, se compararon dos a dos los tiempos de evaluación, por medio del test de Wilcoxon para datos emparejados.

Se han considerado significativos los valores de  $p$  inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Los datos han sido almacenados y analizados mediante el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 18.0 (primer estudio) y 20.0 (segundo estudio).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS DEL PRIMER ESTUDIO (3 + 3 MESES DE SEGUIMIENTO)

#### 4.1.1. *Análisis de la muestra al inicio del estudio*

La muestra al inicio del estudio estaba compuesta por 28 niños y adolescentes diagnosticados de TEA según CIE-10 (Tabla 2).

**Tabla 2. Distribución de la muestra al inicio del estudio (3 + 3 meses) por subcategorías de TEA según CIE-10**

Diagnóstico	Frecuencia	Porcentaje
Autismo (F84.0)	13	46,4
Autismo Atípico (F84.1)	1	3,6
Síndrome de Asperger (F84.5)	5	17,9
TGD sin Especificación (F84.9)	9	32,1

La Tabla 3 muestra las puntuaciones de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III y ABC) al comienzo del estudio.

**Tabla 3. Distribución de las puntuaciones de las escalas ATEC, ERC-III y ABC al inicio del estudio (3 + 3 meses)**

Escalas	n	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo
ATEC	28	74,3 $\pm$ 18,2	38	100
ERC-III	28	30,6 $\pm$ 12,0	3	57
ABC	28	76,2 $\pm$ 34,1	19	137

Las edades al comienzo del estudio estaban comprendidas entre 3 y 16 años, con un valor medio ( $\pm$  DE) de 8,1 años ( $\pm$  3,9). Se observó un claro predominio de varones [25 de 28 (89%)]. No se observaron diferencias significativas por edad ni sexo en las puntuaciones de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III, ABC).

Al comenzar el estudio, 12 de los 28 (43%) participantes estaba en tratamiento psicofarmacológico. No se observaron diferencias significativas en las puntuaciones de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III, ABC) según el criterio de tomar o no tratamiento psicofarmacológico al inicio del estudio.

Los niveles de beta-casomorfina en orina, al inicio del estudio, mostraron una correlación significativa con la edad ( $r_s=0,52$ ;  $p=0,01$ ), pero no con las escalas (Figura 2).

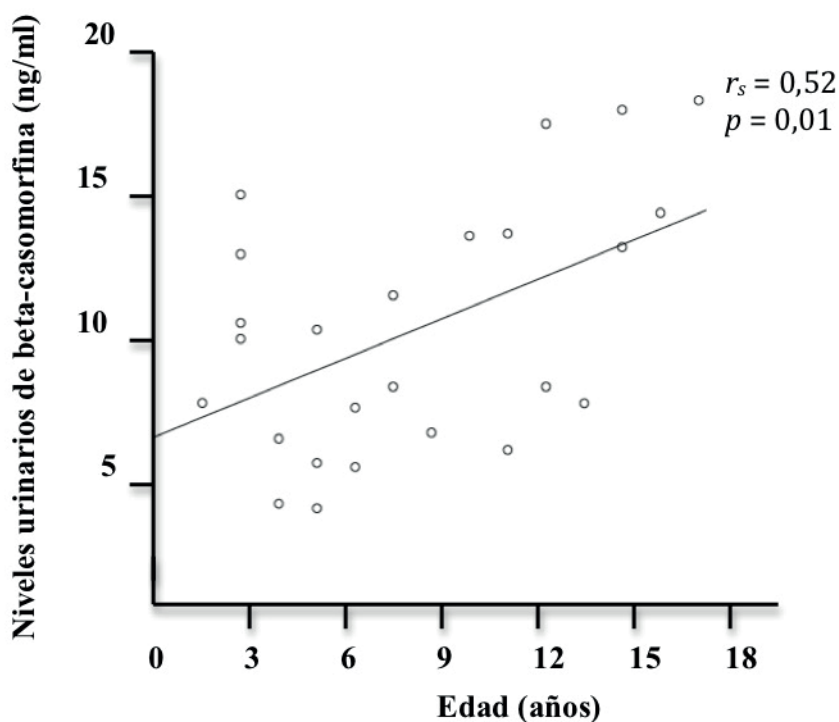


Figura 2. Correlación entre los niveles de beta-casomorfina en orina y la variable edad en T0.

#### 4.1.2. Análisis comparativo de los grupos A y B al inicio del estudio

El grupo A al inicio del estudio estaba constituido por 12 participantes. Se observó un claro predominio de varones [11 de 12 (92%)]. Las edades estaban comprendidas entre 3 y 15 años, con un valor medio ( $\pm$  DE) de 8,3 años ( $\pm$  4,1). El grupo B al inicio del estudio estaba constituido por 16 participantes. Se observó un claro predominio de varones [14 de 16 (88%)]. Las edades estaban comprendidas entre 3 y 16 años, con un valor medio ( $\pm$  DE) de 8,0 años ( $\pm$  4,0). No hubo diferencias significativas en ambos grupos en cuanto al sexo, edad,

distribución de diagnósticos de subcategorías de TEA, valores medios de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III y ABC) ni en cuanto al criterio de que tomaran o no tratamiento psicofarmacológico al inicio del estudio (Tabla 4).

**Tabla 4. Variables demográficas y clínicas según grupos de intervención**

Variables	Total (n=28)	Grupo A (n=12)	Grupo B (n= 16)	<i>p</i>
Sexo				0,61 ( $\chi^2$ )
Varones	25	11	14	
Mujeres	3	1	2	
Edad (Media $\pm$ DE)	8,1	8,3	8,0	0,69 ( <i>t</i> de Student)
Diagnóstico TEA				0,40 ( $\chi^2$ )
Autismo (F84.0)	13	6	7	
Autismo atípico (F84.1)	1	0	1	
Síndrome de Asperger (F84.5)	5	2	3	
TGD sin especificación (F84.9)	9	4	5	
Escalas al inicio (Media $\pm$ DE)				
ATEC	74,3 $\pm$ 18,2	72,0 $\pm$ 15,5	75,9 $\pm$ 20,2	0,3 ( <i>t</i> de Student)
ERC-III	30,6 $\pm$ 12,0	27,7 $\pm$ 13,3	32,5 $\pm$ 11,0	0,9 ( <i>t</i> de Student)
ABC	76,2 $\pm$ 34,1	78,9 $\pm$ 25,8	74,6 $\pm$ 39,0	0,2 ( <i>t</i> de Student)
Tratamiento psicofarmacológico				0,38 ( $\chi^2$ )
Sí	12	4	8	
No	16	8	8	

#### 4.1.3. Flujo de participantes a lo largo del estudio

El número óptimo de pacientes fue fijado en 40 pero sólo fue posible reclutar un total de 32 participantes, de los cuales se asignaron aleatoriamente 16 a cada grupo. Tras la firma del consentimiento informado y la entrega de la guía de implementación de la DLGC, 4 participantes del grupo A rechazaron iniciar el estudio, por lo que el grupo A quedó inicialmente constituido por 12 participantes y el grupo B por 16. A lo largo del estudio, 5 participantes adicionales abandonaron el estudio (dos del grupo A y tres del grupo B), todos ellos durante la fase de DLGC. Los motivos reportados fueron: rechazo a continuar con la dieta (n=4) y enfermedad (infecciones de oído y garganta) coincidiendo con el inicio de la DLGC (n=1). El grupo A finalizó con 10 participantes y el grupo B con 13. La figura 3 muestra el flujo de participantes a lo largo del estudio.

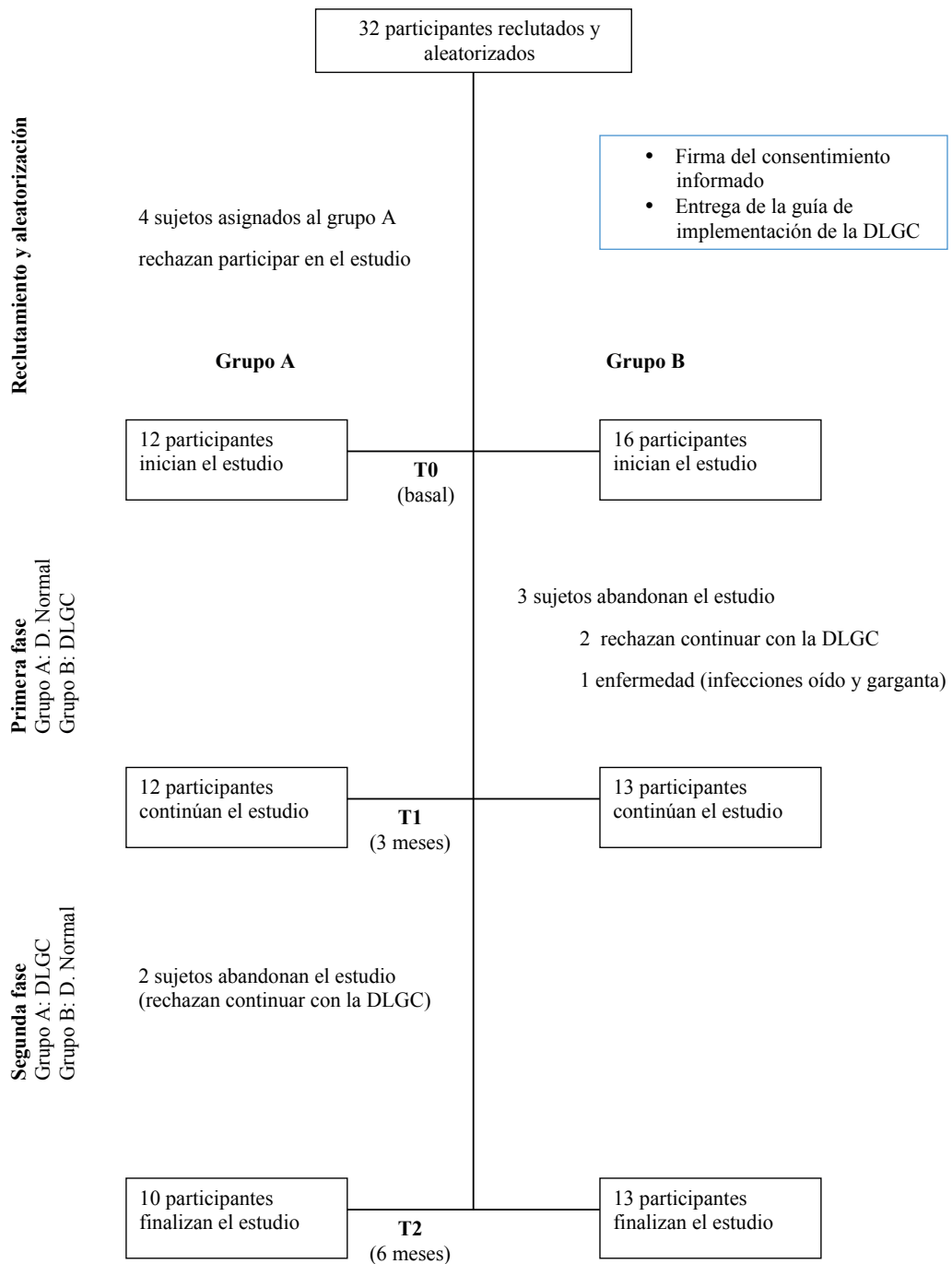


Figura 3. Flujo de participantes a lo largo del estudio (3 + 3 meses).

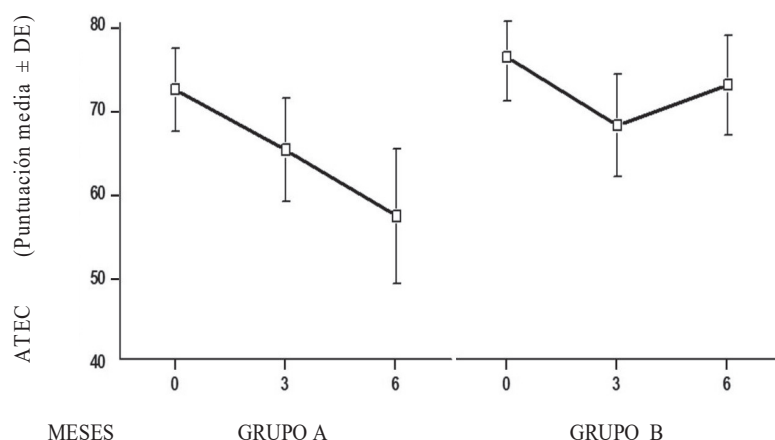
#### 4.1.4. Resultados de las variables e instrumentos de evaluación en T0, T1 y T2

##### Resultados de la escala ATEC

En la escala ATEC, se encontraron en ambos grupos diferencias estadísticamente significativas entre los tres tiempos de evaluación (Tabla 5; Figura 4). Cuando se sub-analizaron los tiempos de evaluación de dos en dos, sólo se encontraron resultados estadísticamente significativos para el grupo B (sub-análisis T0-T1). En el grupo A, se produjo un descenso progresivo de las puntuaciones a lo largo del tiempo, es decir, descendieron tras la dieta normal (T1) y continuaron descendiendo tras la DLGC (T2). Cuando se analizaron los dos grupos conjuntamente (n=23; es decir, contrastando la DLGC con la situación inmediatamente previa), se observó un descenso no significativo de las puntuaciones tras la DLGC.

**Tabla 5. Puntuaciones (media  $\pm$  DE) en la escala ATEC según grupos y tiempos**

Grupo	T0 (basal)	T1 (3 meses)	T2 (6 meses)	<i>p</i> (test de Friedman para datos relacionados)	<i>p</i> (test de Wilcoxon para datos emparejados)
A	74,3 $\pm$ 18,2 (n=12)	64,9 $\pm$ 16,2 (n=12)	57,0 $\pm$ 23,5 (n=10)	0,03	T0-T1: 0,22 T1-T2: 0,06
B	72,0 $\pm$ 15,5 (n=16)	54,9 $\pm$ 30,2 (n=13)	72,6 $\pm$ 19,6 (n=13)	0,03	T0-T1: 0,01 T0-T2: 0,16
Todos	ATEC antes de la DLGC: 72,4 $\pm$ 19,4 (n=28) ATEC después de la DLGC: 69,1 $\pm$ 29,8 (n=23)			<i>d</i> =0,20	0,10



**Figura 4. Puntuación media ( $\pm$  DE) sobre la escala ATEC en la evaluación basal (T0), a los 3 meses (T1) y a los 6 meses (T2) en 10 pacientes del grupo A (primero dieta normal, después DLGC) y 13 pacientes del grupo B (primero DLGC, después dieta normal).**

### Resultados de la escala ERC-III

En la escala ERC-III, el grupo A no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres tiempos de evaluación (Tabla 6). El grupo B mostró un descenso significativo de las puntuaciones entre los tres tiempos de evaluación y al sub-analizar los tiempos de dos en dos. En este grupo, las puntuaciones descendieron tras la DLGC (T1) y siguieron descendiendo, discretamente, tras la dieta normal (T2). Cuando se analizaron los dos grupos conjuntamente (n=23; es decir, contrastando la DLGC con la situación inmediatamente previa), se observó un descenso no significativo de las puntuaciones tras la DLGC.

**Tabla 6. Puntuaciones (media  $\pm$  DE) en la escala ERC-III según grupos y tiempos**

Grupo	T0 (basal)	T1 (3 meses)	T2 (6 meses)	<i>p</i> (test de Friedman para datos relacionados)	<i>p</i> (test de Wilcoxon para datos emparejados)
A	35,2 $\pm$ 15,7 (n=12)	35,0 $\pm$ 16,4 (n=12)	29,6 $\pm$ 11,6 (n=10)	0,3	T0-T1: 0,52 T1-T2: 0,17
B	33,1 $\pm$ 11,5 (n=16)	27,6 $\pm$ 9,2 (n=13)	26,4 $\pm$ 7,9 (n=13)	0,01	T0-T1: 0,03 T0-T2: 0,03
Todos	ERC-III antes de la DLGC: 31,4 $\pm$ 12,5 (n=28) ERC -III después de la DLGC: 30,7 $\pm$ 12,2 (n=23)			d=0,16	0,12

### Resultados de la escala ABC

En la escala ABC, ninguno de los dos grupos mostró diferencias significativas entre los tres tiempos de evaluación (Tabla 7). El grupo A, mostró un descenso (no significativo) de la puntuación entre T0 y T1 (tras dieta normal) y, en contra de lo esperado, la puntuación volvió a aumentar en T2 (tras la DLGC). El grupo B mostró un descenso progresivo (no significativo) de la puntuación de la escala ABC a lo largo del tiempo; es decir, el descenso registrado tras la DLGC (T1) continuó (también inesperadamente) tras la dieta normal (T2). Cuando se analizaron los dos grupos conjuntamente (n=23; es decir, contrastando la DLGC con la situación inmediatamente previa), se observó un descenso no significativo de las puntuaciones tras la DLGC.



**Tabla 7. Puntuaciones (media ± DE) en la escala ABC según grupos y tiempos**

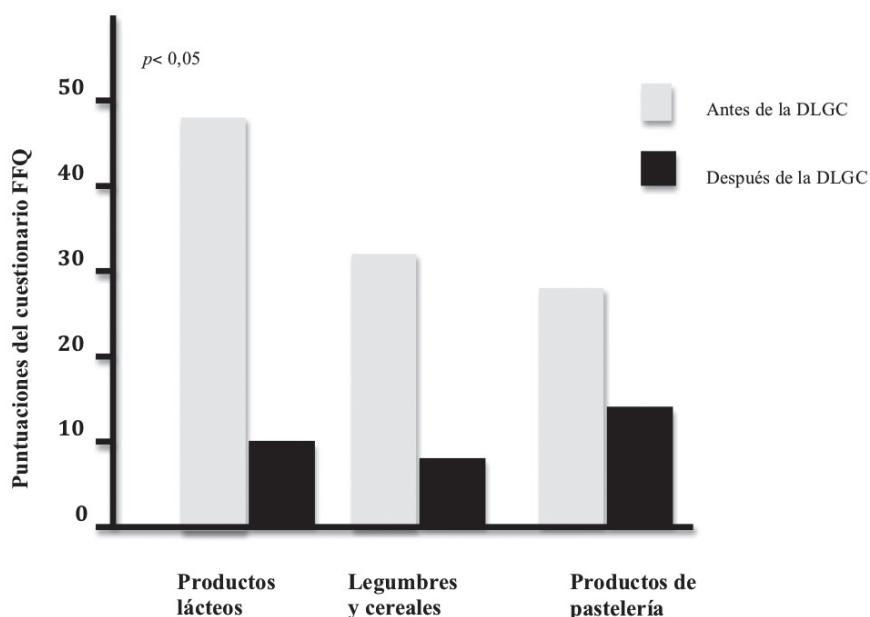
Grupo	T0 (basal)	T1 (3 meses)	T2 (6 meses)	<i>p</i> (test de Friedman para datos relacionados)	<i>p</i> (test de Wilcoxon para datos emparejados)
A	78,9 ± 25,8 (n=12)	37,9 ± 21,7 (n=12)	43,6 ± 21,5 (n=10)	0,2	T0-T1: 0,23 T1-T2: 0,20
B	74,6 ± 39,0 (n=16)	67,4 ± 30,1 (n=13)	59,3 ± 28,5 (n=13)	0,2	T0-T1: 0,29 T0-T2: 0,20
Todos	ABC antes de la DLGC: 69,0 ± 36,9 (n=28) ABC después de la DLGC: 60,0 ± 27,6 (n=23)			d=0,3	0,10

*Resultados de la adherencia a la dieta*

En relación al cuestionario de frecuencia de alimentos FFQ, tras la DLGC se encontró un descenso estadísticamente significativo en las puntuaciones de las categorías de alimentos que contienen gluten y caseína (Tabla 8; Figura 5).

**Tabla 8. Puntuaciones (media ± DE) del cuestionario de frecuencia de alimentos FFQ antes y después de la DLGC**

Puntuación	Media ± DE		<i>p</i> (Prueba U de Mann-Whitney)
	Antes de la DLGC	Después de la DLGC	
Total	277,5 ± 30,6	220,3 ± 21,4	0,07
Productos lácteos	43,1 ± 9,1	8,3 ± 1,1	0,02
Huevos, carnes, pescados	65,6 ± 11,4	68,2 ± 9,1	0,5
Verduras y hortalizas	31,4 ± 3,3	34,7 ± 3,1	0,09
Frutas	32,5 ± 7,4	36,3 ± 5,1	0,07
Legumbres y cereales	28,1 ± 5,3	5,9 ± 2,3	0,02
Aceites y grasas	10,5 ± 2,3	11,6 ± 3,1	0,4
Productos de pastelería	24,3 ± 1,2	10,8 ± 3,3	0,03
Bebidas	23,4 ± 2,4	25,1 ± 3,1	0,08
Miscelánea	18,6 ± 3,5	19,4 ± 1,9	0,3



**Figura 5. Puntuaciones de las categorías del cuestionario de frecuencia de alimentos FFQ que contienen alimentos con gluten y caseína (productos lácteos; legumbres y cereales; y productos de pastelería) antes (rayas grises) y después (rayas negras) de la DLGC.**

### *Resultados de los niveles de beta-casomorfina en orina*

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos grupos cuando se compararon los niveles urinarios de beta-casomorfina entre los tres tiempos de evaluación (Tabla 9).

**Tabla 9. Niveles (media  $\pm$  DE) de beta-casomorfina (ng/ml) según grupos y tiempos**

Grupo	T0 (basal)	T1 (3 meses)	T2 (6 meses)	<i>p</i> (test de Friedman para datos relacionados)	<i>p</i> (test de Wilcoxon para datos emparejados)
A	10,4 $\pm$ 5,2 (n=12)	8,3 $\pm$ 3,9 (n=12)	13,0 $\pm$ 9,0 (n=10)	0,8	T0-T1: 0,66 T1-T2: 0,24
B	9,9 $\pm$ 4,7 (n=16)	10,1 $\pm$ 4,2 (n=13)	10,5 $\pm$ 4,8 (n=13)	0,8	T0-T1: 0,59 T0-T2: 0,98

## 4.2 RESULTADOS DEL SEGUNDO ESTUDIO (6 + 6 MESES DE SEGUIMIENTO)

### 4.2.1. Análisis de la muestra al inicio del estudio

La muestra al inicio del estudio estaba compuesta por 37 niños y adolescentes diagnosticados de TEA según CIE-10 (Tabla 10).

**Tabla 10. Distribución de la muestra al inicio del estudio (6 + 6 meses) por subcategorías de TEA según CIE-10**

Diagnóstico	Frecuencia	Porcentaje
Autismo (F84.0)	21	56,8
Autismo Atípico (F84.1)	1	2,7
Síndrome de Asperger (F84.5)	9	24,3
TGD sin Especificación (F84.9)	6	16,2

La Tabla 11 muestra las puntuaciones de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III y ABC) al comienzo del estudio.

**Tabla 11. Distribución de las puntuaciones de las escalas ATEC, ERC-III y ABC al inicio del estudio (6 + 6 meses)**

Escalas	n	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo
ATEC	37	63,3 $\pm$ 27,7	15	111
ERC-III	37	26,6 $\pm$ 12,2	3	52
ABC	36	43,5 $\pm$ 21,1	3	84

Las edades al comienzo del estudio estaban comprendidas entre 2 y 18 años, con un valor medio ( $\pm$  DE) de 8,9 años ( $\pm$  4,0). La edad (en T0) presentó una correlación ordinal significativa con la escala ATEC ( $r_s = -0,36$ ;  $p = 0,027$ ), pero no con la escala ERC-III ( $r_s = -0,03$ ;  $p = 0,86$ ) ni con la escala ABC ( $r_s = -0,23$ ;  $p = 0,18$ ), a pesar de que las escalas muestran alta correlación entre sí [ATEC con ERC-III,  $r_s = 0,85$  ( $p < 0,001$ ); ATEC con ABC,  $r_s = 0,60$  ( $p < 0,001$ ); ERC-III con ABC,  $r_s = 0,60$  ( $p < 0,001$ )]. La Figura 6 muestra la correlación entre la escala ATEC y la edad.

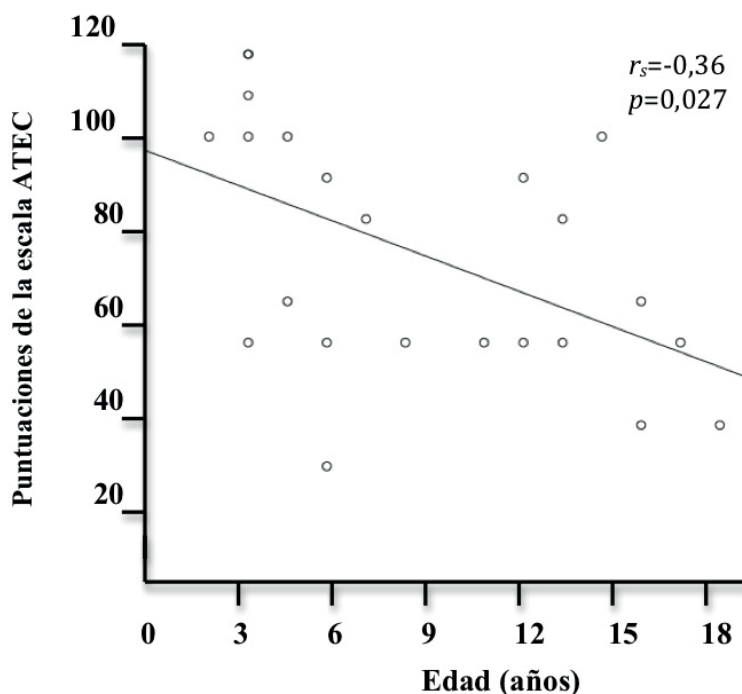


Figura 6. Correlación entre la escala ATEC y la edad en T0.

Se observó un predominio de varones [29 de 37 (78%)]. No se observaron diferencias significativas por sexo en las puntuaciones de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III, ABC) (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de los valores medios de las escalas ATEC, ERC-III Y ABC según el sexo al inicio del estudio

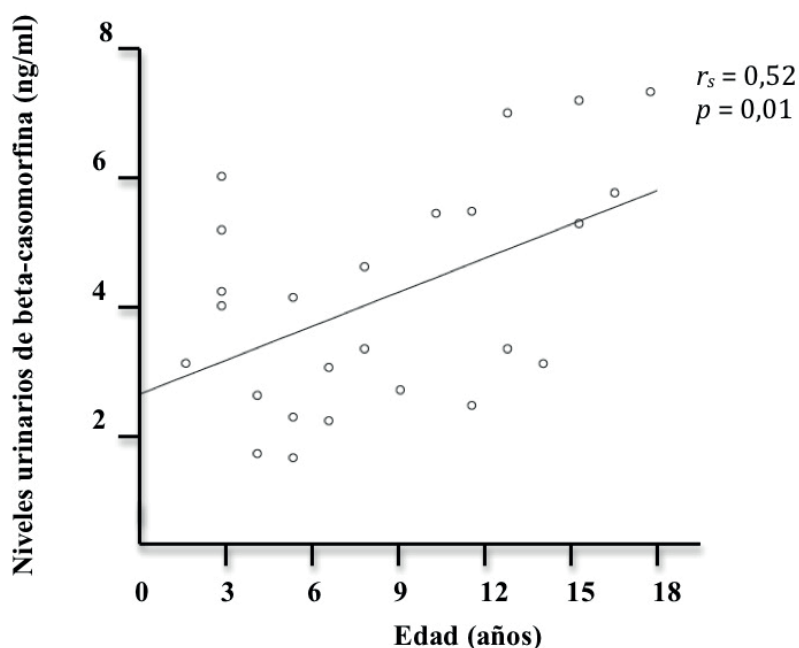
Escalas	Total	Varones	Mujeres	Análisis	
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	<i>t</i>	<i>p</i>
ATEC	63,3 $\pm$ 27,7	63,2 $\pm$ 27,8	63,5 $\pm$ 29,3	-0,29	0,98
ERC-III	26,0 $\pm$ 12,0	26,1 $\pm$ 12,6	26,0 $\pm$ 10,6	0,007	0,99
ABC	43,5 $\pm$ 21,0	46,8 $\pm$ 19,8	31,9 $\pm$ 22,7	1,82	0,07

Al comenzar el estudio, 14 de los 37 (38%) participantes estaba en tratamiento psicofarmacológico. Quienes al comienzo del estudio tomaban tratamiento psicofarmacológico presentaron valores medios significativamente superiores (Tabla 13) en las escalas empleadas (ATEC, ERC-III, ABC).

**Tabla 13. Puntuaciones (media ± DE) de las escalas ATEC, ERC-III Y ABC según los participantes tomen o no tratamiento psicofarmacológico**

Escalas (Media ± DE)	Tratamiento psicofarmacológico		Análisis	
	Sí	No	<i>t</i>	<i>p</i>
ATEC	77,6 ± 21,7	54,5 ± 27,8	-2,66	0,012
ERC-III	34,6 ± 9,6	21,2 ± 10,6	-3,76	0,001
ABC	57,3 ± 15,4	34,7 ± 19,7	-3,65	0,001

Los niveles de beta-casomorfina en orina, al inicio del estudio, mostraron una correlación significativa con la edad ( $r_s=0,41$ ;  $p=0,02$ ), pero no con las escalas (Figura 7).



**Figura 7. Correlación entre los niveles de beta-casomorfina en orina y la variable edad en T0.**

#### 4.2.2. Análisis comparativo de los grupos A y B al inicio del estudio

El grupo A al inicio del estudio estaba constituido por 20 participantes. Se observó un predominio de varones [13 de 20 (65%)]. Las edades estaban comprendidas entre 3 y 16 años, con un valor medio ( $\pm$  DE) de 9,1 años ( $\pm$  3,7). El grupo B al inicio del estudio estaba constituido por 17 participantes. Se observó

un claro predominio de varones [16 de 17 (94%)]. Las edades estaban comprendidas entre 2 y 18 años, con un valor medio ( $\pm$  DE) de 8,8 años ( $\pm$  4,4). El grupo B presentó una proporción de varones significativamente superior al grupo A. No hubo diferencias significativas en ambos grupos en cuanto a la edad, distribución de diagnósticos de subcategorías de TEA, valores medios de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III y ABC) ni en cuanto al criterio de que tomaran o no tratamiento psicofarmacológico al inicio del estudio (Tabla 14).

**Tabla 14. Variables demográficas y clínicas según grupo de intervención**

Variables	Total (n=37)	Grupo A (n=20)	Grupo B (n= 17)	<i>p</i>
Sexo				0,032 ( $\chi^2$ )
Varones	29	13	16	
Mujeres	8	7	1	
Edad (Media $\pm$ DE)	8,9	9,1	8,8	0,83 ( <i>t</i> de Student)
Diagnóstico TEA				0,31 ( $\chi^2$ )
Autismo (F84.0)	21	11	10	
Autismo atípico (F84.1)	1	0	1	
Síndrome de Asperger (F84.5)	9	4	5	
TGD sin especificación (F84.9)	6	5	1	
Escalas al inicio (Media $\pm$ DE)				
ATEC	63,3 $\pm$ 27,7	64,1 $\pm$ 28,7	62,3 $\pm$ 27,4	0,9 ( <i>t</i> de Student)
ERC-III	26,0 $\pm$ 12,0	26,7 $\pm$ 13,3	25,0 $\pm$ 10,7	0,5 ( <i>t</i> de Student)
ABC	43,5 $\pm$ 21,0	43,1 $\pm$ 22,4	44,0 $\pm$ 20,0	0,8 ( <i>t</i> de Student)
Tratamiento psicofarmacológico				0,33 ( $\chi^2$ )
Sí	14	9	5	
No	23	11	12	

#### 4.2.3. Flujo de participantes a lo largo del estudio

Se reclutaron en total 40 participantes y se asignaron 20 a cada grupo. Tras la firma del consentimiento informado y la entrega de la guía de implementación de la DLGC, 3 participantes del grupo B rechazaron iniciar el estudio, por lo que el grupo A quedó inicialmente constituido por 20 participantes y el grupo B por 17. Durante la primera fase del estudio, 4 participantes del grupo A abandonaron el estudio (dos individuos diagnosticados de alergia al gluten y dos individuos que rechazaron continuar con el estudio) y 2 participantes en el Grupo B (dos individuos diagnosticados de alergia a la caseína). En la segunda fase del estudio se perdieron 2 participantes en el grupo A (dos individuos que rechazaron continuar el estudio). El grupo A finalizó con 14 participantes y el grupo B con 15. La Figura 8 muestra el flujo de participantes a lo largo del estudio.

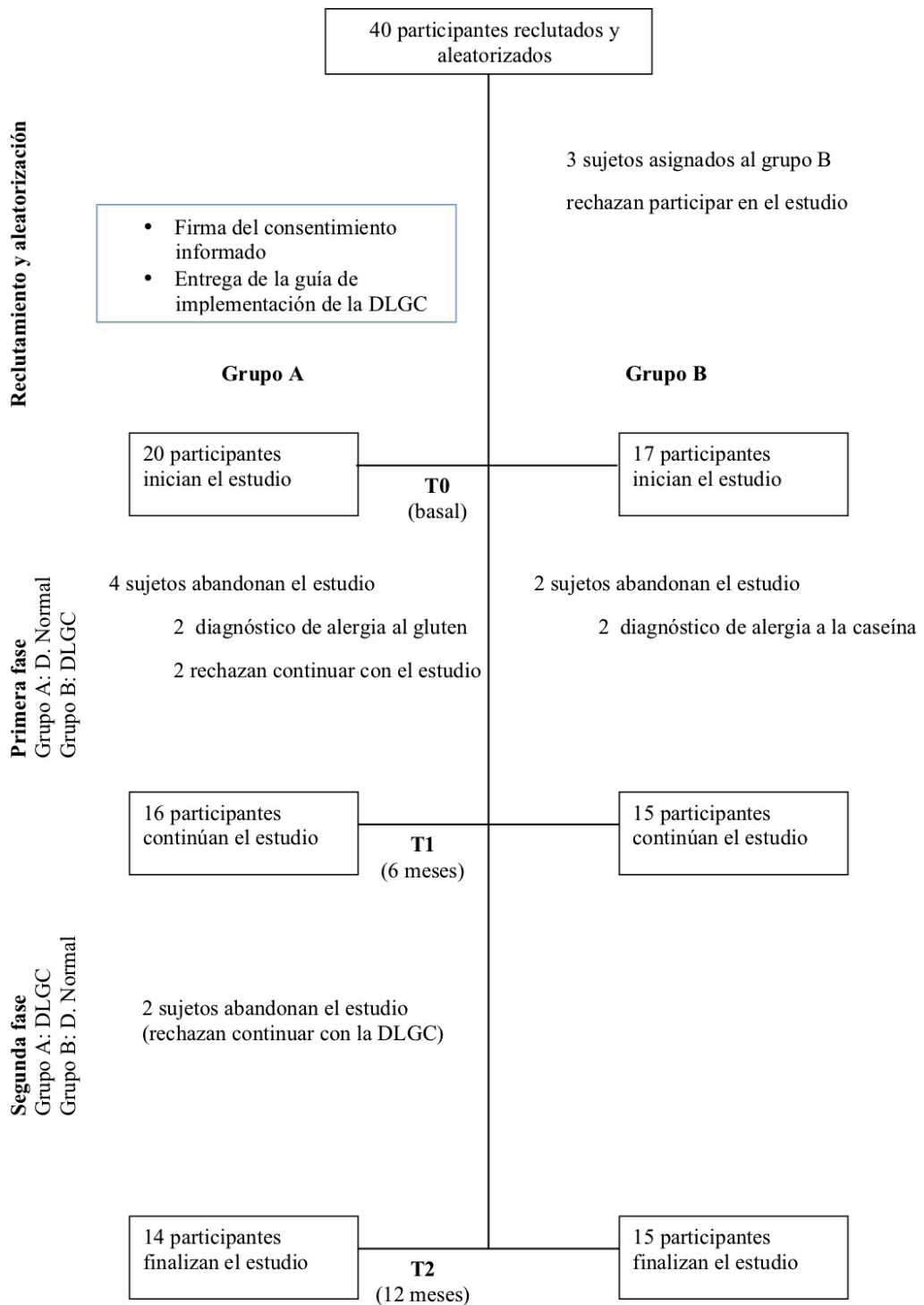


Figura 8. Flujo de participantes a lo largo del estudio (6 + 6 meses).

#### 4.2.4. Resultados de las variables e instrumentos de evaluación en T0, T1 y T2

##### Resultados de la escala ATEC

En la escala ATEC, ninguno de los dos grupos mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres tiempos de evaluación (Tabla 15). En ambos grupos, las puntuaciones de T1 y T2 fueron menores que las de T0. El descenso en ambos grupos fue mayor en T1 que en T2 (es decir, tras la DLGC para el grupo B y, sorprendentemente, tras la dieta normal para el grupo A). Cuando se analizaron los dos grupos conjuntamente ( $n=29$ ; es decir, contrastando la DLGC con la situación inmediatamente previa), se observó un descenso no significativo de las puntuaciones tras la DLGC, con un muy pequeño tamaño del efecto ( $d=0,10$ ).

**Tabla 15. Puntuaciones (media  $\pm$  DE) en la escala ATEC según grupos y tiempos**

Grupo	T0 (basal)	T1 (6 meses)	T2 (12 meses)	<i>p</i> (test de Friedman para datos relacionados)	<i>p</i> (test de Wilcoxon para datos emparejados)
A	64,1 $\pm$ 28,7 ( $n=20$ )	62,9 $\pm$ 28,9 ( $n=16$ )	63,8 $\pm$ 29,7 ( $n=14$ )	0,4	T0-T1: 0,4 T1-T2: 0,8
B	62,3 $\pm$ 27,4 ( $n=17$ )	54,9 $\pm$ 20,9 ( $n=15$ )	55,7 $\pm$ 26,7 ( $n=15$ )	0,3	T0-T1: 0,09 T0-T2: 0,3
Todos	ATEC antes de la DLGC: 62,1 $\pm$ 27,7 ( $n=33$ ) ATEC después de la DLGC: 59,1 $\pm$ 29,8 ( $n=29$ )			$d=0,10$	0,24

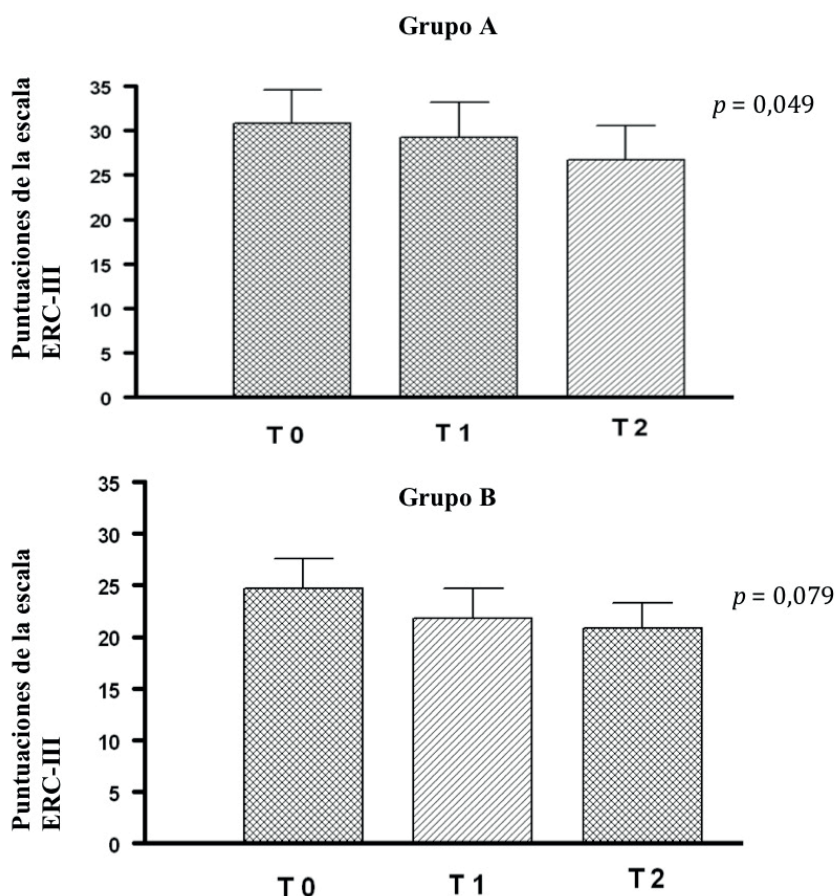
##### Resultados de la escala ERC-III

En la escala ERC-III, solo el grupo A mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tres tiempos de evaluación (Tabla 16; Figura 9). El grupo B mostró un descenso progresivo (no significativo) de la puntuación de la escala ERC-III a lo largo del tiempo; es decir, el descenso registrado tras la DLGC (T1) continuó observándose (no significativamente) tras la dieta normal (T2). Cuando se analizaron los dos grupos conjuntamente ( $n=29$ ; es decir, contrastando la DLGC con la situación inmediatamente previa), se observó un descenso no significativo de las puntuaciones tras la DLGC, con un muy pequeño tamaño del efecto ( $d=0,16$ ).



**Tabla 16. Puntuaciones (media  $\pm$  DE) en la escala ERC-III según grupos y tiempos**

Grupo	T0 (basal)	T1 (6 meses)	T2 (12 meses)	<i>p</i> (test de Friedman para datos relacionados)	<i>p</i> (test de Wilcoxon para datos emparejados)
A	27,9 $\pm$ 13,6 (n=20)	27,7 $\pm$ 14,7 (n=16)	26,7 $\pm$ 14,4 (n=14)	0,049	T0-T1: 0,19 T1-T2: 0,17
B	25,0 $\pm$ 10,7 (n=17)	21,8 $\pm$ 11,3 (n=15)	20,9 $\pm$ 9,3 (n=15)	0,079	T0-T1: 0,42 T0-T2: 0,12
Todos	ERC-III antes de la DLGC: 26,3 $\pm$ 12,7 (n=33) ERC -III después de la DLGC: 24,2 $\pm$ 12,9 (n=29)			d=0,16	0,12



**Figura 9. Puntuación media ( $\pm$  DE) sobre la escala ERC-III en la evaluación basal (T0), a los 6 meses (T1) y a los 12 meses (T2) en 14 pacientes del grupo A (primero dieta normal, después DLGC) y otros 15 del grupo B (primero DLGC, después dieta normal).**

### Resultados de la escala ABC

En la escala ABC, ninguno de los dos grupos mostró diferencias significativas entre los tres tiempos de evaluación (Tabla 17). El grupo A, mostró un descenso (no significativo) de la puntuación entre T0 y T1 (tras la dieta normal) y, en contra de lo esperado, una puntuación mayor en T2 (tras la DLGC) que en T0 y que en T1. El grupo B mostró un descenso progresivo (no significativo) de la puntuación a lo largo del tiempo; es decir, el descenso registrado tras la DLGC (T1) continuó (también inesperadamente) tras la dieta normal (T2). Cuando se analizaron los dos grupos conjuntamente (n=28; es decir, contrastando la DLGC con la situación inmediatamente previa), se observó un aumento no significativo de las puntuaciones tras la DLGC, con un muy pequeño tamaño del efecto (d=0,07).

**Tabla 17. Puntuaciones (media  $\pm$  DE) en la escala ABC según grupos y tiempos**

Grupo	T0 (basal)	T1 (6 meses)	T2 (12 meses)	<i>p</i> (test de Friedman para datos relacionados)	<i>p</i> (test de Wilcoxon para datos emparejados)
A	43,1 $\pm$ 22,4 (n=20)	37,9 $\pm$ 21,7 (n=16)	43,6 $\pm$ 21,5 (n=14)	0,4	T0-T1: 0,044 T1-T2: 0,32
B	44,0 $\pm$ 20,0 (n=16)	41,0 $\pm$ 25,3 (n=14)	39,8 $\pm$ 18,6 (n=14)	0,1	T0-T1: 0,33 T0-T2: 0,096
Todos	ABC antes de la dieta de exclusión: 40,9 $\pm$ 20,8 (n=32) ABC después de la dieta de exclusión: 42,3 23,0 (n=28)			d=0,07	0,94

### Resultados de la adherencia a la dieta

Los resultados de la adherencia a las intervenciones dietéticas (dieta normal y DLGC) medida a través del recuerdo de 24 horas muestran que el 82,8 % de la muestra fueron buenos cumplidores (siguieron las recomendaciones dietéticas en un 80-100%). El 13,8 % fueron regulares cumplidores (cumplimiento del 50-79%) y el 3,4 % restante fueron malos cumplidores (cumplimiento menor del 50%) (Figura 10). Los resultados de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III, ABC) no variaron cuando el análisis se limitó a los 24 participantes que fueron buenos cumplidores.

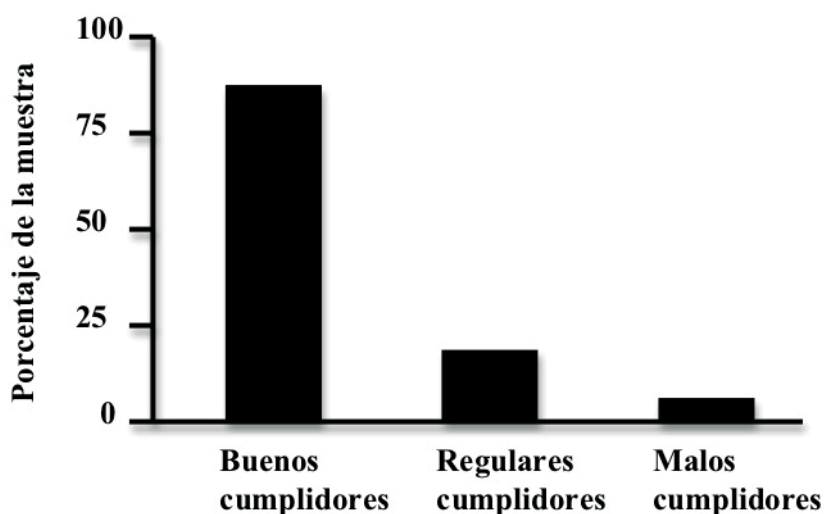


Figura 10. Distribución de la muestra según el grado de cumplimiento de la dieta (medido a través del Recuerdo de 24 horas). Los participantes fueron clasificados en tres grupos: buenos cumplidores (cumplimiento del 80-100%), regulares cumplidores (cumplimiento del 50-79%) y malos cumplidores (cumplimiento menor del 50%).

#### *Resultados de los niveles de beta-casomorfina en orina*

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos grupos cuando se compararon los niveles urinarios de beta-casomorfina entre los tres tiempos de evaluación (Tabla 18).

**Tabla 18. Niveles (media  $\pm$  DE) de beta-casomorfina (ng/ml) según grupos y tiempos**

Grupo	T0 (basal)	T1 (6 meses)	T2 (12 meses)	<i>p</i> (test de Friedman para datos relacionados)	<i>p</i> (test de Wilcoxon para datos emparejados)
A	2,44 $\pm$ 2,8 (n=18)	2,56 $\pm$ 3,9 (n=12)	2,30 $\pm$ 3,0 (n=10)	0,4	T0-T1: 0,66 T1-T2: 0,24
B	3,36 $\pm$ 2,4 (n=16)	3,22 $\pm$ 4,6 (n=12)	2,44 $\pm$ 4,9 (n=14)	0,9	T0-T1: 0,46 T0-T2: 0,52

## Resultados de los parámetros de riesgo y seguridad

### Autoinmunidad

En la primera evaluación se diagnosticaron dos individuos de alergia al gluten y otros dos individuos de alergia a la caseína (Figura 8).

### Hemograma y bioquímica

Las variables nutricionales analizadas (calcio, vitamina D, ferritina, ácido fólico, IGF-1 y hematocrito) no mostraron diferencias significativas al compararlas entre antes y después de la DLGC (Tabla 19).

### Resultados del seguimiento pondero-estatural

El índice de masa corporal no mostró diferencias significativas al compararlo entre antes y después de la DLGC (Tabla 19).

**Tabla 19. Puntuaciones (media  $\pm$  DE) de las variables nutricionales y antropométricas antes y después de la DLGC**

Variables	Antes de la DLGC	Después de la DLGC	<i>p</i> (Wilcoxon para datos emparejados)
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	18,4 $\pm$ 4,2 (n=34)	18,7 $\pm$ 4,3 (n=29)	0,92
Calcio (mg/dl)	9,9 $\pm$ 0,4 (n=25)	9,8 $\pm$ 0,5 (n=27)	0,47
Vitamina D (ng/ml)	26,3 $\pm$ 7,8 (n=24)	29,0 $\pm$ 10,6 (n=23)	0,20
Ferritina (ng/ml)	46,1 $\pm$ 33,6 (n=25)	48,7 $\pm$ 41,2 (n=26)	0,97
Ácido fólico (ng/ml)	10,7 $\pm$ 3,9 (n=25)	10,8 $\pm$ 5,2 (n=24)	0,95
IGF-1 (ng/ml)	233,3 $\pm$ 156,7 (n=24)	233,5 $\pm$ 161,8 (n=23)	0,36
Hematocrito (%)	39,4 $\pm$ 3,2 (n=25)	39,8 $\pm$ 2,8 (n=27)	0,99

## *Resultados de los antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario*

El 76,5% de la muestra encuestada (n=34) presentó antecedentes de trastornos gastrointestinales, siendo el más frecuente de ellos el dolor/cólico abdominal (41,2%). El 88,2% de la muestra encuestada (n=34) presentó antecedentes de trastornos del comportamiento alimentario, siendo el más frecuente de ellos la dificultad para incorporar alimentos nuevos (52,9%). Los resultados de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III, ABC) no variaron cuando el análisis se limitó a los 27 participantes que tenían o bien antecedentes de trastornos gastrointestinales o bien del comportamiento alimentario. La tabla 20 muestra la frecuencia y el porcentaje de antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario.

**Tabla 20. Antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario**

Antecedentes	Frecuencia	Porcentaje
Trastornos gastrointestinales	34	100
Alergias alimentarias	6	17,6
Dolor/cólico abdominal	14	41,2
Vómitos	8	23,5
Diarreas	4	11,8
Estreñimiento	11	29,7
Meteorismo	10	29,4
Todos	26	76,5
<hr/>		
Trastornos del comportamiento alimentario	34	100
Dificultad para incorporar sólidos	10	29,4
Alimentación limitada a leche y otros líquidos a los 12-15 meses	8	23,5
No usar cuchara a los 15 meses	11	32,4
Usar biberón a los 15 meses	14	41,2
Dificultad para incorporar alimentos nuevos	18	52,9
Dificultades previas en la masticación	9	26,5
Dificultades actuales en la masticación	9	26,5
Restricción alimentaria a 3-4 comidas	11	32,4
Regurgitación frecuente de alimentos	1	2,9
Comer muy despacio	7	20,6
Incapacidad para absorber con pajita	5	14,7
Alimentación actual triturada o en puré	2	5,9
Conductas de pica	4	11,8
Todos	30	88,2



## 5. DISCUSIÓN

---

Es interesante resaltar que, en una primera aproximación a nuestros resultados, observamos que los cambios conductuales tras la DLGC son muy escasos. Nuestros hallazgos son concordantes con los de otros trabajos (Elder *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a; Seung *et al.*, 2007), pero no con los de todos (Adams *et al.*, 2018; El Rashidy *et al.*, 2017; Ghalichi *et al.*, 2016; Knivsberg *et al.*, 1990, 1995 y 2002; Lucarelli *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2014; Whiteley *et al.*, 1999 y 2010a). La discrepancia de resultados en las investigaciones en torno a este tema estimula a los autores a seguir realizando estudios de alta calidad metodológica que incluyan herramientas de evaluación cada vez más precisas, como son los marcadores de actividad inflamatoria, enzimática y de permeabilidad intestinal (Srikantha y Mohajeri, 2019) o la determinación de las concentraciones y de la actividad de péptidos de origen exógeno como la beta-casomorfina (Jarmolowska *et al.*, 2019). En nuestras investigaciones, los niveles de beta-casomorfina en orina no se vieron modificados tras la intervención dietética. Sin embargo, nuestras cifras de comorbilidad con trastornos gastrointestinales (76,5%) y del comportamiento alimentario (88,2%) fueron elevadas, lo que apoya la teoría intestino-cerebral del autismo (Brantl *et al.*, 1979; Reichelt *et al.*, 1991 y 2012 ).

### 5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 5.1.1. Cuestionarios de conducta

Globalmente, los resultados muestran que tras la DLGC los cambios en los trastornos del comportamiento medidos a través de las escalas ATEC, ERC-III y ABC son mínimos. Para el primer estudio (3 + 3 meses de seguimiento), se observó una disminución estadísticamente significativa de las puntuaciones tras la DLGC en la escala ATEC (para ambos grupos) (Figura 4) y en la escala ERC-III

(solo para el grupo B). Para el segundo estudio (6 + 6 meses de seguimiento), solo en la escala ERC-III y solo para el grupo A se hallaron resultados significativos tras la DLGC, pero con un tamaño de efecto muy pequeño (Figura 9). En ambos estudios, cuando se midió el efecto de la DLGC uniendo los grupos A y B, es decir, contrastando la DLGC (T1 para el grupo B y T2 para el grupo A) con la situación inmediatamente previa (T0 para el grupo B y T1 para el grupo A) se obtuvo un descenso (no significativo) en las puntuaciones de las escalas empleadas tras la DLGC.

Se encontraron algunos hallazgos inesperados. En ambos estudios y para el grupo A, las puntuaciones de la escala ATEC descendieron respecto a la situación basal (T0) tanto tras la dieta normal (T1) como tras la DLGC (T2) (Figura 4); existe una correlación negativa documentada en la bibliografía entre la escala ATEC y la edad (Mahapatra *et al.*, 2018) que podría explicar este descenso de las puntuaciones en la escala ATEC a lo largo del tiempo. En el segundo estudio, la variable edad (en T0) presentó una correlación ordinal significativa con la escala ATEC ( $r_s = -0,36$ ;  $p = 0,027$ ) (Figura 6), pero no con la escala ERC-III ( $r_s = -0,03$ ;  $p = 0,86$ ) ni con la escala ABC ( $r_s = -0,23$ ;  $p = 0,18$ ), a pesar de que las escalas muestran una alta correlación entre sí [ATEC con ERC-III,  $r_s = 0,85$  ( $p < 0,001$ ); ATEC con ABC,  $r_s = 0,60$  ( $p < 0,001$ ); ERC-III con ABC,  $r_s = 0,60$  ( $p < 0,001$ )]. Sin embargo, este fenómeno no ocurrió en el grupo B donde las puntuaciones de la escala ATEC, como era de esperar, descendieron tras la DLGC (T1) y volvieron a aumentar tras la dieta normal (T2). Estos resultados inesperados en la escala ATEC podrían, entonces, explicarse por el orden de la intervención del grupo A (primero dieta normal) y la esperable deseabilidad de los padres de observar pronto una mejoría en sus hijos (Dosman *et al.*, 2013).

Un fenómeno similar al anterior ocurrió, en este caso, en el grupo B y para las escalas ERC-III y ABC de ambos estudios, donde las puntuaciones descendieron tanto tras la dieta de exclusión (T1) como tras la dieta normal (T2) (Figura 9). En este caso y dado el orden de intervención del grupo B (primero DLGC), este hecho podría deberse a que se mantuviera una cierta “inercia” en los cuidados dietéticos restrictivos tras la mejoría alcanzada en T1.

Un tercer y último resultado inesperado ocurrió en ambos estudios en el grupo A, donde las puntuaciones de la escala ABC no solo descendieron tras la dieta normal (T1), sino que además volvieron a aumentar (incluso por encima de T0 en el segundo estudio) tras la DLGC. Quizás sea este el resultado más inesperado y controvertido de todos, ya que implica un hallazgo completamente opuesto al de nuestra hipótesis: mejorar tras la dieta normal y empeorar tras la DLGC. En primer lugar, cabe señalar que estos resultados no fueron estadísticamente significativos y que, en el caso del segundo estudio, el rango de las puntuaciones fue muy estrecho entre los tres tiempos de evaluación ( $43,1 \pm$



22,4 en T0;  $37,9 \pm 21,7$  en T1; y  $43,6 \pm 21,5$  en T2). Por otro lado, la escala ABC es la menos específica de nuestras tres herramientas para evaluar síntomas conductuales en el autismo, a pesar de que otros autores la han utilizado en estudios similares al nuestro (Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a). En relación a este hallazgo, cabe contemplar la posibilidad de que los participantes empeoraran durante el periodo de DLGC debido a la restricción de alimentos que puede suponer la retirada del gluten y de la caseína de la dieta, sumado a la selectividad en la elección de las comidas y a los trastornos del comportamiento alimentario descritos en la población autista (Díaz-Atienza *et al.*, 2012). En cualquier caso, este fenómeno de “efecto paradójico” no se observó ni en el grupo B ni en el resto de las escalas empleadas.

El hecho de no encontrar resultados concluyentes en nuestra investigación puede atribuirse a varias causas que se discuten a continuación.

En primer lugar, podría ocurrir que los instrumentos de evaluación empleados (ATEC, ERC-III y ABC) no fueran suficientemente sensibles al cambio. Sin embargo, estas escalas han sido empleadas en numerosos estudios sobre intervenciones nutricionales y dietéticas en TEA (Adams *et al.*, 2018; Amminger *et al.*, 2007; Bent *et al.*, 2011 y 2014; Bertoglio *et al.*, 2010; Elder *et al.*, 2006; El-Rashidy *et al.*, 2018; Grimaldi *et al.*, 2018; Hendren *et al.*, 2016; Lucarelli *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a; Voigt *et al.*, 2014; Whiteley *et al.*, 1999; Yui *et al.*, 2012); otra escala de evaluación llamada CARS (*Childhood Autism Rating Scale*; Schopler *et al.*, 1980) y correlacionada ( $r_s=0,71$ ;  $p<0.001$ ) con la escala ATEC (Geier *et al.*, 2014), fue utilizada en un estudio de diseño cruzado similar al nuestro (Elder *et al.*, 2006) que tampoco mostró diferencias tras la DLGC.

En segundo lugar, podría ocurrir que aún siendo instrumentos adecuados, nuestras escalas no fueran sensibles al cambio durante el periodo de tiempo evaluado. En contra de esta hipótesis está el hecho de que el primer estudio mostró más resultados significativos que el segundo, que tuvo un tiempo de seguimiento mayor.

Esta diferencia en la cantidad de resultados significativos entre el primer y el segundo estudio enlaza con la tercera de las razones que podría explicar la ausencia de resultados concluyentes tras la DLGC y que es la falta de cumplimiento en la dieta. De este modo, el primer estudio habría mostrado más cambios que el segundo porque, *a priori*, sería más difícil mantener una adherencia a la dieta durante un periodo de seguimiento más largo (Reichelt *et al.*, 2012). El tema de la adherencia a la dieta se discute ampliamente en una sección aparte (apartado 5.1.2 *protocolo de adherencia a la dieta*).

Si se descarta, entonces, que la ausencia de diferencias significativas en nuestra investigación sea debida a la falta de sensibilidad al cambio por parte

de nuestros instrumentos de evaluación y/o a problemas en la adherencia a la dieta, habría que deducir que de hecho la DLGC no acarrea cambios en los síntomas, a diferencia de los hallazgos de algunos estudios (Adams *et al.*, 2018; El Rashidy *et al.*, 2017; Ghalichi *et al.*, 2016; Knivsberg *et al.*, 1995 y 2002; Lucarelli *et al.*, 1995; Reichelt *et al.*, 1991; Whiteley *et al.*, 1999 y 2010a) y en coincidencia con otros trabajos (Elder *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a; Seung *et al.*, 2007).

### 5.1.2. Protocolo de adherencia a la dieta

En general, los resultados encontrados en ambos estudios muestran que el cumplimiento de la intervención dietética (incluir gluten y caseína durante la fase de dieta normal y excluirlos durante la fase de DLGC) fue el adecuado. En el primer estudio, se observó tras la DLGC un descenso estadísticamente significativo de las puntuaciones en las categorías del cuestionario de frecuencia de alimentos que contienen mayoritariamente alimentos con gluten y caseína: productos lácteos, cereales y productos de pastelería (Figura 5). Para el segundo estudio, los resultados de la adherencia a la dieta medida a través del recuerdo de 24 horas mostraron que 24 de los 29 (83%) participantes que finalizaron el estudio fueron buenos cumplidores, esto es, siguieron adecuadamente las dos modalidades de intervención dietética en más de un 80% (Figura 10). Los resultados de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III y ABC) no variaron cuando el análisis se limitó a los 24 participantes que fueron buenos cumplidores.

Los estudios de intervención dietética se vienen llevando a cabo desde hace décadas para monitorizar la ingesta de alimentos en niños (Johnson *et al.*, 1986). No obstante, estos trabajos son objeto de controversia (Foster y Bradley, 2018) debido a los sesgos que conllevan (infraestimación de las calorías consumidas, sesgos de recuerdo y de deseabilidad social, etc.). Los cuestionarios de frecuencia de alimentos, como el que utilizamos en nuestro primer estudio, tienen la ventaja de que realizan un rastreo de los principales alimentos que se consumen en un determinado entorno y pueden así evitar olvidos. Las desventajas son que pueden resultar tediosos de cumplimentar (nuestro cuestionario consta de 120 ítems distribuidos en 9 categorías) y que, además, están influidos por el sesgo de recuerdo (en nuestro estudio, había que recordar la frecuencia de consumo de cada alimento de los tres meses anteriores). Por estas limitaciones, en el segundo estudio se empleó el método del recuerdo de 24 horas, que es el más utilizado actualmente por su sencillez y rapidez (Foster y Bradley, 2018) y que, además, ha sido empleado en otros estudios relacionados con las DLGC (El-Rashidy *et al.*, 2017; Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011).

Es conocido en la bibliografía que las familias de personas afectas de TEA suelen encontrar serias dificultades para seguir adecuadamente las recomendaciones dietéticas (Adams *et al.*, 2018). Un estudio encabezado por Johnson y colaboradores (año 2011, Estados Unidos) utilizó el recuerdo de 24 horas para monitorizar la adherencia a la DLGC (grupo de intervención) y a la dieta normal (grupo control). Entre otros hallazgos, encontraron que en el grupo de intervención se cometían más errores dietéticos que en el grupo control y que en el primer grupo los errores eran más frecuentes al final de la intervención, lo que refleja la dificultad de los padres en instaurar y mantener este tipo de dietas y la disminución del interés con el paso del tiempo, sobre todo si no se encuentran mejorías evidentes (Pennesi y Klein, 2012). Hay que tener presente que los errores dietéticos también pueden ocurrir durante el periodo de dieta normal; es bien sabido por los padres de los participantes de este tipo de estudios que durante la DLGC el objetivo es excluir por completo los alimentos que contienen gluten y caseína. Sin embargo, durante la fase de dieta normal las cantidades de gluten y caseína ingeridas pueden variar de unos participantes a otros, y podría ocurrir que se redujera la ingesta de estos componentes de la dieta, especialmente si durante la DLGC se ha encontrado alguna mejoría. Este fenómeno ocurrió en nuestra investigación, donde las puntuaciones de los cuestionarios ERC-III y ABC para el grupo B descendieron tras la DLGC (T1) y siguieron descendiendo (no significativamente) tras la dieta normal (T2) (Figura 9). Por último, hay que contemplar también la posibilidad de que se cometan errores dietéticos fuera del ámbito de los cuidadores principales, por ejemplo, estando en casa de los abuelos, con otros familiares o amigos, o en fiestas de cumpleaños (Pennesi y Klein, 2012).

Uno de los principales retos, por lo tanto, de los estudios con DLGC es el control del sesgo en la intervención dietética, un problema que solo puede resolverse *a priori* llevando a cabo estudios a doble ciego (Elder *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 2016; Lucarelli *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a). Como discutiremos más ampliamente en el apartado 5.2 *Fortalezas y limitaciones*, el principal inconveniente de los estudios de intervención dietética a doble ciego es la monitorización de la dieta durante un largo periodo de tiempo y el reclutamiento de un amplio grupo de participantes (Whiteley *et al.*, 2010a).

### 5.1.3. Niveles de beta-casomorfina en orina

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos estudios ni de los dos grupos cuando se compararon los niveles urinarios de beta-casomorfina entre los tres tiempos de evaluación. En el segundo

estudio, por problemas técnicos de laboratorio no fue posible disponer del resultado en todas las muestras (Tabla 18).

Algunos estudios han sugerido que las concentraciones urinarias de beta-casomorfina son superiores en niños con autismo (Reichelt y Knivsberg, 2003; Sokolov *et al.*, 2014; Tveiten *et al.*, 2014). Sokolov y colaboradores (2014) encontraron, además, una correlación positiva entre los niveles de beta-casomorfina y la gravedad de los trastornos de conducta. En nuestra investigación, no se encontró ninguna relación entre los niveles urinarios de beta-casomorfina al inicio de los estudios y la gravedad de los síntomas comportamentales medida a través de las escalas ATEC, ERC-III y ABC (Tablas 3 y 11). Los niveles de beta-casomorfina en orina, al inicio de los estudios, mostraron una correlación significativa con la edad (Figuras 2 y 7). Este hecho podría deberse a que en sujetos mayores existe menor selectividad a los alimentos y una mayor tolerancia a la caseína, por lo que la ingesta de este componente de la dieta podría estar aumentada, o bien podría explicarse por diferencias en la metabolización según la edad (Boukthir *et al.*, 2010; Charman *et al.*, 2005; Cieslinska *et al.*, 2015; Díaz-Atienza *et al.*, 2012).

A partir de nuestros resultados, no podemos sacar conclusiones al respecto de si en la población autista los niveles de péptidos opioides son mayores que en la población no autista, ya que nuestro diseño cruzado utiliza como control al propio paciente.

Nuestros hallazgos, en cambio, deben compararse con los resultados de aquellos estudios que han realizado mediciones de péptidos opioides antes y después de la DLGC. Otro ensayo clínico de diseño cruzado similar al de nuestra investigación (Elder *et al.*, 2006) tampoco mostró diferencias significativas en los niveles urinarios de péptidos derivados del gluten y de la caseína (gluteomorfinina y caso-morfina, respectivamente) entre la fase de dieta normal y la de DLGC. Sin embargo, en el estudio de Knivsberg y colaboradores (1990 y 1995) se redujeron los niveles de péptidos urinarios tras la DLGC.

Una de las principales cuestiones en torno a la determinación de los niveles de beta-casomorfina es la técnica que se utiliza para el análisis de estas sustancias. Clásicamente, la determinación de la peptiduria se realizaba a través de técnicas cromatográficas (Reichelt *et al.*, 1986 y 1991). Sin embargo, estas técnicas son herramientas de separación de sustancias pero no de identificación molecular, así que los estudios más recientes han empleado técnicas combinadas de cromatografía y espectrometría (como las utilizadas en el segundo estudio) para la determinación de estos péptidos (Cass *et al.*, 2008; Dettmer *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2003) o han intentado determinar otras sustancias derivadas de otros péptidos o aminoácidos como la glicina (Dalton *et al.*, 2017).

El énfasis actual en la investigación de los péptidos opioides en el autismo reside en estudiar marcadores indirectos de la actividad biológica de estas proteínas (Cieślińska *et al.*, 2015; Jarmolowska *et al.*, 2019), como es el caso de la enzima dipeptidil peptidasa-4 que se encarga de hidrolizar la beta-casomorfina en el intestino, o de los receptores opioides  $\mu$  a los que se unen estas sustancias en el cerebro.

#### 5.1.4. *Parámetros de riesgo y seguridad*

Dadas las limitaciones en el tratamiento de los TEA, muchas familias recurren a otros métodos alternativos (Owen-Smith *et al.*, 2015; Salomone *et al.*, 2015), a menudo sin supervisión médica. Los estudios más recientes muestran que hasta el 33% de los padres ocultan la información de los tratamientos/suplementos nutricionales al médico responsable del seguimiento de sus hijos (Trudeau *et al.*, 2019) y que hasta un 20% de los niños con TEA en edad preescolar utilizan o han utilizado dietas de restricción (Rubenstein *et al.*, 2018).

Algunos autores han sugerido que el uso de dietas de eliminación puede producir riesgos para la salud debido a ciertas deficiencias nutricionales, fundamentalmente en lo que se refiere al déficit de calcio tras la exclusión de los productos lácteos (Hediguer *et al.*, 2008; Konstantynowicz *et al.*, 2007) que consecuentemente podría alterar el crecimiento óseo (Monti *et al.*, 2007; Neumeier *et al.*, 2013).

Tan solo una minoría de los ensayos clínicos publicados sobre DLGC en autismo han utilizado variables de riesgo y seguridad (Elder *et al.*, 2006; El-Rashidy *et al.*, 2017; Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011; Knivsberg *et al.*, 2010a) y ninguno de ellos ha mostrado efectos secundarios aparentes hasta el momento. Nuestros resultados son concordantes con los de estos autores, ya que muestran que la DLGC no supone riesgos aparentes para la salud medidos a través de las variables nutricionales y antropométricas analizadas (calcio, vitamina D, ferritina, ácido fólico, IGF-1, hematocrito e índice de masa corporal) (Tabla 19).

Las intervenciones dietéticas en los TEA han sido muy cuestionadas también por el impacto que pueden producir en las rutinas de estos niños y en los patrones selectivos y restringidos alimentarios que existen de por sí en esta población (Cornish, 2002). Por otro lado, las restricciones dietéticas pueden limitar aún más el ámbito de socialización (como las fiestas de cumpleaños, excursiones, etc.) y aumentar la estigmatización. Al finalizar nuestro segundo estudio (6 + 6 meses), realizamos una encuesta de satisfacción a los padres cuyos resultados mostraron que casi la mitad de ellos (45%) continuaría la DLGC después del estudio, más de la mitad (66%) recomendaría la dieta a otras per-

sonas y sólo una minoría (7%) consideró la intervención dietética como un estigma/limitación importante.

#### 5.1.5. Antecedentes de trastornos gastrointestinales y del comportamiento alimentario

La primera descripción formal de los síntomas autísticos, realizada por Leo Kanner en 1943, contiene ya referencias a síntomas gastrointestinales en algunos de los casos que publicó. En nuestro segundo estudio (6 + 6 meses), el 76,5 % (n=34) de los participantes tenía antecedentes de trastornos gastrointestinales. De todos ellos, el más frecuente fue el dolor/cólico abdominal, presente en cerca de la mitad de los casos (41,2%). Se ha sugerido que la sensación de dolor en los niños con TEA pudiera expresarse a través de alteraciones del comportamiento como irritabilidad u oposicionismo, dadas las dificultades en esta población para el reconocimiento y la comunicación de las emociones (Nygaard, 2010).

Nuestra metodología no incluyó instrumentos para medir específicamente los posibles cambios en los síntomas gastrointestinales tras la DLGC y, de hecho, son escasos los ensayos clínicos sobre DLGC que los contemplan (Johnson *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a).

Ghalichi y colaboradores (2016) encontraron una prevalencia de trastornos gastrointestinales del 53,9% en los 80 niños con autismo que fueron estudiados y hallaron una reducción estadísticamente significativa de estos síntomas en el grupo que se sometió a una dieta libre de gluten (n=40). Estos resultados hablan a favor de una posible conexión entre la ingesta de determinados alimentos, como los derivados lácteos, y la clínica digestiva (Boukthir *et al.*, 2010; Díaz-Atienza *et al.*, 2012) e impulsan nuevas investigaciones con subpoblaciones de autismo que presenten síntomas gastrointestinales comórbidos y otros marcadores relacionados (Penzol *et al.*, 2019). En nuestras muestras, los resultados de las escalas empleadas (ATEC, ERC-III, ABC) tampoco variaron cuando el análisis se limitó a los 27 participantes que tenían o bien antecedentes de trastornos gastrointestinales o bien del comportamiento alimentario.

Es bien conocida en la bibliografía la relación entre TEA y sensibilidad al gluten, tanto celíaca como no celíaca (Asperger, 1961; Lau *et al.*, 2013). Asimismo, se ha sugerido que la alergia a la caseína es más prevalente entre los sujetos diagnosticados de autismo (Reichelt *et al.*, 2012). Es interesante destacar que en nuestro primer estudio no hubo ningún caso de alergia al gluten ni a la caseína y, sin embargo, en el segundo estudio se diagnosticaron (en T0) dos casos de enfermedad celíaca y otros dos casos de alergia a la caseína, obteniendo cifras de prevalencia en ambos casos (5,4%) concordantes con otros estudios (Barcia

*et al.*, 2008; Host y Halken, 2014). Es posible que en la muestra del primer estudio existieran participantes con sensibilidad al gluten no celíaca y/o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca que no fueran detectadas en las pruebas inmunológicas convencionales, de ahí la importancia de encontrar marcadores bioquímicos específicos en la población autista, especialmente en aquellos casos con comorbilidad gastrointestinal (Catassi *et al.*, 2013).

Los resultados de nuestra investigación muestran que el 88,2% de la muestra encuestada (n=34) presentó algún antecedente de trastorno del comportamiento alimentario, siendo el más frecuente de todos ellos la dificultad para incorporar alimentos nuevos, presente en 18 de los 34 (52,9%) participantes encuestados, lo que refuerza la idea de la selectividad y la restricción de alimentos inherentes al síndrome autista (Cornish, 2002).

## 5.2. FORTALEZAS Y LIMITACIONES

### 5.2.1. Fortalezas

Desde que en 1990 Knivsberg y colaboradores publicaran los resultados del primer ensayo clínico formal sobre DLGC en el autismo, los trabajos en este área de investigación han ido creciendo en número y en variedad metodológica. No obstante, el debate sobre la eficacia y el mecanismo de acción de estas intervenciones sigue vigente actualmente (Cieślińska *et al.*, 2017; Piwowarczyk *et al.*, 2018).

Nuestros dos ensayos clínicos se suman a la docena de trabajos publicados sobre este tema hasta el momento y, en concreto, a aquellos que no han encontrado resultados concluyentes (Elder *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2015; Puspongoro *et al.*, 2015a; Seung *et al.*, 2007).

Una de las principales aportaciones de nuestra investigación es el empleo de una metodología de diseño cruzado en el seguimiento de un grupo amplio de pacientes (n=28 para el primer estudio y n=37 para el segundo) sometidos a una DLGC durante un largo periodo de tiempo (3 meses para el primer estudio y 6 meses para el segundo). Nuestra metodología *cross-over* se inspiró en un trabajo publicado hace 15 años por un grupo de investigadores norteamericanos (Elder *et al.*, 2006) que tampoco encontraron resultados concluyentes pero que sugirieron en sus conclusiones aumentar el tiempo de intervención (6 + 6 semanas) y el tamaño de muestra (n=15). El diseño cruzado reduce la variabilidad entre sujetos (cada participante se comporta, a la vez, como paciente y como control) y permite trabajar estadísticamente como si tuviésemos el doble de muestra. Se decidió dividir la muestra en dos grupos (A y B), cada uno de ellos



con distinto orden de intervención dietética, para controlar el sesgo evolutivo: los cambios clínicos y conductuales de los sujetos podrían deberse al paso del tiempo y no a la exclusión del gluten y de la caseína (Charman *et al.*, 2005).

En cuanto al amplio grupo de participantes reclutados cabe señalar que eran necesarios 30 participantes, según el cálculo de tamaño muestral realizado, que se basó (Knivsberg *et al.*, 2002) en una ventaja del 50% entre 10 sujetos con DLGC y otros 10 con dieta normal (en diseño paralelo) y con un tamaño del efecto ( $d$  de Cohen) de 1,13. Aunque el tamaño de muestra también podría ser considerado *a priori* como una limitación del estudio, se han de tener en cuenta varios factores. La mayoría de los ensayos clínicos referentes a este tema han utilizado tamaños de muestra inferiores al nuestro (Elder *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011; Knivsberg *et al.*, 1990, 1995 y 2002; Lucarelli *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 2015; Seung *et al.*, 2007; Whiteley *et al.*, 1999). Por otro lado y como ya se ha señalado, el diseño cruzado del estudio aporta la ventaja estadística de como si se duplicara el número de participantes (cada sujeto es, al mismo tiempo, caso y control), por lo que es como si se dispusiera de 74 participantes para el segundo estudio.

Muchos investigadores de este área de estudio se han esforzado en diseñar ensayos clínicos con un periodo mínimo de DLGC establecido en 3 meses, basándose en la evidencia de que los residuos del gluten y sus bio-productos permanecen activos en el intestino de las personas afectadas de enfermedad celíaca hasta 12 semanas después de retirar el gluten de la dieta (Kumar *et al.*, 1979). La puesta en marcha de nuestro segundo estudio, con un seguimiento de 6 meses de DLGC, fue impulsada por los resultados del trabajo *Scanbrit* (Pedersen *et al.*, 2014; Whiteley *et al.*, 2010a) que mostró mejorías durante el primer año y un efecto meseta durante el segundo año de intervención con DLGC. Este trabajo tiene el mayor tiempo de seguimiento hasta la fecha, 24 meses, y sus autores sugieren que para poder evaluar razonablemente la respuesta a una DLGC es necesario un periodo de intervención de al menos 6 meses. Por su parte, Pennesi y Klein (2012) encontraron en la información aportada por los padres que los mayores resultados eran descritos a partir de los 6 meses con una DLGC. El resto de los ensayos clínicos disponibles hasta el momento, salvo dos de ellos con la misma duración que el nuestro y que tampoco encontraron cambios significativos tras la dieta (Hyman *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2011), tienen periodos de seguimiento inferiores, lo cual ha sido señalado en los trabajos de revisión como una de las principales limitaciones para este tipo de investigaciones (Dosman *et al.*, 2013; Marí-Bauset *et al.*, 2014; Millward *et al.*, 2008; Mulloy *et al.*, 2010; Pedersen *et al.*, 2014; Piwowarczyk *et al.*, 2018; Sathe *et al.*, 2017; Whiteley *et al.*, 2010b).



### 5.2.2. Limitaciones

No hemos incluido periodo de lavado entre las dos intervenciones, ya que los efectos de la segunda intervención se miden 3 meses (para el primer estudio) o 6 meses (para el segundo estudio) después de finalizar la primera, sin que pudieran existir, *a priori*, efectos residuales derivados de la anterior intervención (Kumar *et al.*, 1979).

Nuestros estudios incluyeron niños y adolescentes como participantes. Algunos estudios sobre DLGC en autismo evitan incluir adolescentes (Whiteley *et al.*, 2010a) para evitar la influencia de los cambios conductuales que ocurren con el inicio de la pubertad (Gillberg y Schaumann, 1981). La edad de nuestros participantes, por lo tanto, englobó un amplio espectro (entre 2 y 18 años). Este hecho aumenta la variabilidad interindividual en relación a la variable edad, que (en T0) presentó una correlación significativa con la escala ATEC (en el segundo estudio) pero no con las escalas ERC-III ni ABC. La correlación de la escala ATEC con la edad, como ya se ha comentado anteriormente, está descrita en la literatura científica (Mahapatra *et al.*, 2018). En cualquier caso, ambos grupos partieron de una distribución similar en cuanto a la edad de sus participantes (Tablas 4 y 14).

La principal limitación de nuestros estudios es la dificultad para poder monitorizar la intervención dietética durante un periodo de tiempo tan largo. Todos los trabajos a doble ciego realizados hasta el momento (Elder *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 2016; Navarro *et al.*, 2015; Pusponegoro *et al.*, 2015a) salvo uno (Lucarelli *et al.*, 1995), han arrojado resultados negativos tras la DLGC. Una de las principales dificultades en este tipo de estudios reside, pues, en establecer una intervención dietética que, por un lado, sea controlada a doble ciego pero que, además, se lleve a cabo durante un periodo de tiempo suficiente (Pedersen *et al.*, 2014; Whiteley *et al.*, 2010a).

### 5.3. PERSPECTIVAS FUTURAS

Con el fin de identificar a los posibles respondedores, sería interesante incluir entre los elementos de evaluación marcadores de comorbilidad de síntomas gastrointestinales, mediciones de permeabilidad intestinal, exámenes de poblaciones bacterianas intestinales, actividad enzimática e inflamatoria gastrointestinal, así como pruebas de imagen cerebral para el estudio de los posibles cambios estructurales y funcionales.

Sería también interesante incluir estudios de diagnóstico genético (cariotipo, array CGH, paneles génicos, etc.) para tratar de correlacionar determinadas

variantes y subtipos de autismo sindrómico con comportamientos específicos a nivel gastrointestinal y de respuesta a estas dietas. La genética también juega un papel fundamental y prometedor en los estudios más recientes que evalúan de forma indirecta la actividad de los péptidos opioides a través de la expresión génica de los enzimas y receptores sobre los que actúan (Jarmolowska *et al*, 2019).

## 6. CONCLUSIONES

---

**Primera.** Una DLGC no produce cambios significativos en los trastornos del comportamiento asociados al autismo.

**Segunda.** Los niveles urinarios de beta-casomorfina no se ven modificados tras la DLGC.

**Tercera.** Existe una evidencia limitada para recomendar estas intervenciones nutricionales en los TEA.

**Cuarta.** Son necesarios futuros ensayos clínicos aleatorizados durante un periodo de tiempo adecuado que, además, incluyan elementos de placebo y doble ciego. Con el fin de identificar a los posibles respondedores, sería interesante incluir, entre los elementos de evaluación, comorbilidades de síntomas gastrointestinales, mediciones de permeabilidad intestinal, exámenes de poblaciones bacterianas intestinales, actividad enzimática e inflamatoria gastrointestinal, así como el estudio de los posibles cambios estructurales y funcionales a nivel cerebral.

**Quinta.** Es importante llevar a cabo una monitorización de parámetros bioquímicos y antropométricos, con el fin de prevenir posibles deficiencias nutricionales derivadas del uso de estas dietas.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Adams JB, Audhya T, Geis E, Gehn E, Fimbres V, Pollard EL, Mitchell J, Ingram J, Hellmers R, Laake D, Matthews JS, Li K, Naviaux JC, Naviaux RK, Adams RL, Coleman DM, Quig DW (2018). Comprehensive Nutritional and Dietary Intervention for Autism Spectrum Disorder. A Randomized, Controlled 12-Month Trial. *Nutrients* 10: 369.
- Adams JB, Audhya T, McDonough-Means S, Rubin RA, Quig D, Geis E, Gehn E, Loresto M, Mitchell J, Atwood S, Barnhouse S, Lee W (2011). Effect of a vitamin/mineral supplement on children and adults with autism. *BMC Pediatr* 11: 111.
- Adams JB, Romdalvik J, Ramanujam VM, Legator MS (2007). Mercury, lead and zinc in baby teeth of children with autism versus controls. *J Toxicol Environ Health A* 70: 1046–1051.
- Afzal N, Murch S, Thirrupathy K, Berger L, Fagbemi A, Heuschkel R (2003). Constipation with acquired megarectum in children with autism. *Pediatrics* 112: 939–942.
- Agostoni C, Nobile M, Ciappolino V, Delvecchio G, Tesei A, Turolo S, Crippa A, Mazzocchi A, Altamura CA, Brambilla P (2017). The Role of Omega-3 Fatty Acids in Developmental Psychopathology: A systematic review on Early Psychosis, Autism, and ADHD. *Int J Mol Sci* 18: 2608.
- Aman MG, Singh NN (1986). *Aberrant Behavior Checklist Manual*. New York: Slosson Educational Publications.
- Aman MG, Singh NN, Stewart AW, Field CJ (1985). The Aberrant Behavior Checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. *Am J Ment Defic* 89: 485–491.
- Amminger GP, Berger GE, Schäfer MR, Klier C, Friedrich MH, Feucht M (2007). Omega-3 fatty acids supplementation in children with autism: a double-blind randomized, placebo-controlled pilot study. *Biol Psychiatry* 61: 551–553.

- Amminger GP, Schäfer MR, Papageorgiou K, Klier CM, Cotton SM, Harrigan SM, Mackinnon A, McGorry PD, Berger GE (2010). Long-chain omega-3 fatty acids for indicated prevention of psychotic disorders: a randomized, placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 67: 146–154.
- Amy S (2017). Interventions Targeting Sensory Challenges in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Pediatrics* 139.
- Arnold GL, Hyman SL, Mooney RA, Kirby RS (2003). Plasma aminoacids profiles in children with autism: Potential risk of nutritional deficiencies. *J Autism Dev Disord* 33: 449–454.
- Arrigoni O, De Tullio MC (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta* 1569: 1–9.
- Ashwood P, Anthony A, Pellicer AA, Torrente F, Walker-Smith JA, Wakefield AJ (2003). Intestinal lymphocyte populations in children with regressive autism: evidence for extensive mucosal immunopathology. *J Clin Immunol* 23: 504–517.
- Asperger H (1961). Psychopathology of children with celiac disease. *Ann Paediatr* 197: 346–351.
- Ayala P (2014). *Detección de beta-7-casomorfina en orina de niños con autismo*. (Tesis Doctoral. Universidad Complutense, Madrid). Recuperado de <https://eprints.ucm.es/33392/1/T36474.pdf>.
- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M (1995). Autism as a strongly genetic disorder: Evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25: 63–77.
- Barcia G, Posar A, Santucci M, Parmeggiani A (2008). Autism and coeliac disease. *J Autism Dev Disord* 38: 407–408.
- Baron-Cohen S, Scott FJ, Allison C, Williams J, Bolton P, Matthews FE, Brayne C (2009). Prevalence of autism-spectrum conditions: UK school-based population study. *Br J Psychiatry* 194: 500–509.
- Barthélémy C, Adrien JL, Tanguay P, Garreau P, Fermanian J, Roux S, Sauvage D, Lelord G (1990). The Behavioral Summarized Evaluation (BSE): Validity and Reliability of a scale for the assessment of autistic behaviors. *J Autism Dev Disord* 20: 189–204.
- Barthélémy C, Roux S, Adrien JL, Hameuri L, Guérin P, Fermanian J, Lelord G (1997). Validation of the Revised Behavior Summarized Evaluation Scale. *J Autism Dev Disord* 27: 139–153.
- Bashir S, Al-Ayadhi LY (2014). Effect of camel milk on thymus and activation-regulated chemokine in autistic children: double-blind study. *Pediatr Res* 75: 559–563.

- Bent S, Bertoglio K, Ashwood P, Bostrom A, Hendren RL (2011). A pilot randomized controlled trial of omega-3 fatty acids for autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 41: 545–554.
- Bent S, Hendren RL, Zandi T, Law K, Choi J-E, Widjaja F, Kalb L, Nestle J, Law P (2014). Internet-based, randomized, controlled trial of omega-3 fatty acids for hyperactivity in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 53: 658–666.
- Berk M, Sanders KM, Pasco JA, Jacka FN, Williams LJ, Hayles AL, Dodd S (2007). Vitamin D deficiency may play a role in depression. *Med Hypotheses* 69: 1316–1319.
- Bertoglio K, Jill James S, Deprey L, Brule N, Hendren RL (2010). Pilot study of the effect of methyl B12 treatment on behavioral and biomarker measures in children with autism. *J Altern Complement Med* 16: 555–560.
- Biesiekierski JR (2017). What is gluten? *J Gastroenterol Hepatol* 32 (Supl 1): 78–81.
- Bjørklund G, Waly MI, Al-Farsi Y, Saad K, Dadar M, Rahman, MM, Elhoufey A, Chirumbolo S, Jóźwik-Pruska J, Kałużna-Czaplińska J, Kałużna-Czaplińska J (2019). The Role of Vitamins in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know? *J Mol Neurosci* 67: 373–387.
- Black C, Kaye JA, Jick H (2002). Relation of childhood gastrointestinal disorders to autism: nested case-control study using data from the UK General Practice Research Database. *BMJ* 325: 419–421.
- Borre YE, Moloney RD, Clarke G (2014) The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms and therapeutic potential. *Adv Exp Med Biol* 817: 373–403.
- Boukthir S, Matoussi N, Belhadj A, Mammou S, Dlala SB, Helayem M, Rocchiccioli F, Bouzaidi S, Abdennebi M (2010). Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Tunis Med* 88: 685–686.
- Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton MJ, Arshad SH, Bahna SL, Beck LA, Byrd-Bredbenner C, Camargo CA Jr, Eichenfield L, Furuta GT, Hanifin JM, Jones C, Kraft M, Levy BD, Lieberman P, Luccioli S, McCall KM, Schneider LC, Simon RA, Simons FE, Teach SJ, Yawn BP, Schwaninger JM (2010). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol* 126: S1–S58.
- Boyle CA, Boulet S, Schieve LA, Cohen RA, Blumberg SJ, Yeargin-Allsopp M, Visser S, Kogan MD (2011). Trends in the Prevalence of Developmental Disabilities in US Children, 1997-2008. *Pediatrics* 127: 1034–1042.
- Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ 3<sup>rd</sup>, Furuta GT, Levy J, Vandewater J, Whitaker AH, Atkins D, Bauman ML, Beaudet AL, Carr EG, Gershon MD, Hyman SL,

- Jirapinyo P, Jyonouchi H, Kooros K, Kushak R, Levitt P, Levy SE, Lewis JD, Murray KF, Natowicz MR, Sabra A, Wershil BK, Weston SC, Zeltzer L, Winter H (2010). Evaluation, diagnosis and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics* 125: S1–S18.
- Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, Lottspeich F (1979). Novel opioid peptides derived from casein (B-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360: 1211–1224.
- Cabral R, Arrieta FJ, Vicente F, Cordobés FJ, Moreno B (2004). Adult oligosymptomatic coeliac disease. *An Med Interna* 21: 599–601.
- Cade R, Privette M, Fregly M, Rowland N, Sun Z, Zele V, Wagemaker H, Edelstein C (2000). Autism and schizophrenia: intestinal disorders. *Nutr Neurosci* 3: 57–72.
- Campbell DB, Li C, Sutcliffe JS, Persico AM, Levitt P (2008). Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism Res* 1: 159–168.
- Cannell JJ (2017). Vitamin D and autism, what’s new? *Rev Endocr Metab Disord* 18: 183–193.
- Cass H, Gringras P, March J, McKendrick I, O’Hare AE, Owen L, Pollin C (2008). Absence of urinary opioid peptides in children with autism. *Arch Dis Child* 93: 745–750.
- Castro K, Faccioli LS, Baronio D, Gottfried C, Perry IS, dos Santos Riesgo R (2015). Effect of a ketogenic diet on autism spectrum disorder: A systematic review. *Res Autism Spectr Disord* 20: 31–38.
- Catassi C, Bai JC, Bonaz B, Bouma G, Calabró A, Carroccio A, Castillejo G, Ciacci C, Cristofori F, Dolinsek J, Francavilla R, Elli L, Green P, Holtmeier W, Koehler P, Koletzko S, Meinhold C, Sanders D, Schumann M, Schuppan D, Ullrich R, Vécsei A, Volta U, Zevallos V, Sapone A, Fasano A (2013). Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. *Nutrients* 5: 3839–3853.
- Cekici H, Sanlier N (2019). Current nutritional approaches in managing autism spectrum disorder: a review. *Nutr Neurosci* 22: 145–155.
- Cieślińska A, Fiedorowicz E, Zwierzowski G, Kordulewska N, Jarmolowska B, Kostyra E (2019). Genetic polymorphism of  $\beta$ -casein gene in polish red cattle-preliminary study of A1 and A2 frequency in genetic conservation herd. *Animals (Basel)* 9.
- Cieślińska A, Kostyra E, Kostyra H, Olenski K, Fiedorowicz E, Kaminski S (2012). Milk from cows of different B-casein genotypes as a source of B-casomorphin-7. *Int J Food Sci Nutr* 63: 426–430.



- Cieślińska A, Kostyra E, Savelkoul HFJ (2017). Treating autism spectrum disorder with gluten-free and casein-free diet: the underlying microbiota-gut-brain axis mechanisms. *J Clin Immunol Immunother* 3: 9.
- Cieślińska A, Sienkiewicz-Szłapka E, Wasilewska J, Fiedorowicz E, Chwała B, Moszyńska-Dumara M, Cieśliński T, Bukalo M, Kostyra E (2015). 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* 65: 6–11.
- Chang JP, Su KP, Mondelli V, Pariante CM (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in youths with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: a systematic review and meta-analysis of clinical trials and biological studies. *Neuropsychopharmacology* 43: 534–545.
- Charman T, Taylor E, Drew A, Cockerill H, Brown J, Baird G (2015). Outcome at 7 years of children diagnosed with autism at age 2: predictive validity of assessments conducted at 2 and 3 years of age and pattern of symptom change overtime. *J Child Psychol Psychiatry* 46: 500–513.
- Chow SC, Chang M (2008). Adaptive design methods in clinical trials – a review. *Orphanet J Rare Dis* 3: 11.
- Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P (1999). Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am J Clin Nutr* 53: 106–111.
- Cooper BT, Holmes GK, Ferguson R, Thompson RA, Allan RN, Cooke WT (1980). Gluten-sensitive diarrhea without evidence of celiac disease. *Gastroenterol* 79: 801–806.
- Cornish E (2002). Gluten and casein free diets in autism: a study of the effects on food choice and nutrition. *J Hum Nutr Diet* 15: 261–269.
- Croen LA, Grether JK, Yoshida CK, Odouli R, Hendrick V (2011). Antidepressant use during pregnancy and childhood autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry* 68: 1104–1112.
- Cruchet S, Lucero Y, Cornejo V (2016). Truths, myths and needs of special diets: attention-deficit/hyperactivity disorder, autism, non-celiac gluten sensitivity, and vegetarianism. *Ann Nutr Metab* 68 (Supl 1): 43–50.
- Cummins AG, Penttila IA, Labrooy JT, Robb TA, Davidson GP (1991). Recovery of the small intestine in coeliac disease on a gluten free diet: Changes in intestinal permeability, small bowel morphology and T-Cell activity. *J Gastroenterol Hepatol* 6: 53–57.
- Dalton NR, Chandler S, Turner C, Charman T, Pickles A, Loucas T, Simonoff E, Sullivan P, Baird G (2014). Gut permeability in autism spectrum disorder. *Autism Res* 7: 305–313.

- Dalton NR, Chandler S, Turner C, Charman T, Pickles A, Simonoff E, Baird G (2017). Measurement of urine indolylacrylglycine is not useful in the diagnosis or dietary management of autism. *Autism Res* 10: 408–413.
- Damodaran LPM, Arumugam G (2011). Urinary oxidative stress markers in children with autism. *Redox Rep* 16: 216–222.
- Dawson G, Jones EJ, Merkle K, Venema K, Lowy R, Faja S, Kamara D, Murias M, Greenson J, Winter J, Smith M, Rogers SJ, Webb SJ (2012). Early behavioral intervention is associated with normalized brain activity in young children with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 51: 1150–1159.
- Dean OM, Gray KM, Villagonzalo KA, Dodd S, Mohebbi M, Vick T, Tonge BJ, Berk M (2016). A randomised, double blind, placebo-controlled trial of a fixed dose of N-acetyl cysteine in children with autistic disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 51: 241–249.
- De Angelis M, Francavilla R, Piccolo M, De Giacomo A, Gobetti M (2015). Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes* 6: 207–213.
- Deepmala, Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, Spielholz C, Frye R (2015). Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 55: 294–321.
- Della Ragione F, Vacca M, Fioriniello S, Pepe G, D'Esposito M (2016). MECP2, a multi-talented modulator of chromatin architecture. *Brief Funct Genomics* 15: 420–431.
- D'eufermia P, Celli M, Finocchiaro R, Pacifico L, Viozzi L, Zaccagnini M, Cardi E, Giardini O (1996). Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr* 85: 1076–1079.
- de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Froli A, Iardino P, Carteni M, De Rosa M, Francavilla R, Riegler G, Militerni R, Bravaccio C (2010). Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51: 418–424.
- Dettmer K, Hanna D, Whetstone P, Hansen R, Hammock BD (2007). Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. *Anal Bioanal Chem* 388: 1643–1651.
- Devlin B, Scherer SW (2012). Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* 22: 229–237.
- Díaz-Atienza F, Serrano S, González-Domenech PJ, García C (2012). Prevalencia de alteraciones de la conducta alimentaria, trastornos gastrointestinales e infecciones recurrentes en niños afectados de Trastornos del Espectro autista (TEA) en comparación con sus hermanos sanos. *Rev Psiquiatr Infancia Juv* 29: 11–16.

- Doeniyas C (2018). Dietary interventions for autism spectrum disorder: New perspectives from the gut-brain axis. *Physiol Behav* 194: 577–582.
- Dohan FC (1966). Cereals and schizophrenia. Data and hypothesis. *Acta Psychiatr Scand* 42: 125–152.
- Dohan FC, Graberger JC (1973). Relapsed schizophrenics: earlier discharge from the hospital after cereal-free, milk-free diet. *Am J Psychiatry* 130: 685–686.
- Dolske MC, Spollen J, McKay S, Lancashire E, Tolbert L (1993). A preliminary trial of ascorbic acid as supplemental therapy for autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 17: 765–74.
- Dosman C, Adams D, Wudel B, Vogels L, Turner J, Vohra S (2013). Complementary, holistic, and integrative medicine: autism spectrum disorder and gluten-and casein-free diet. *Pediatr Rev* 34: e36-e41.
- Eirís-Puñal J, Gómez-Lado C, Castro-Gago M (2008). How valuable are genetic studies in paediatric neurology? *Rev Neurol* 47: S65–S73.
- Elder JH, Kreider CM, Schaefer NM, de Laosa MB (2015). A review of gluten- and casein-free diets for treatment of autism: 2005-2015. *Nutr Diet Suppl* 7: 87–101.
- Elder JH, Shankar M, Shuster J, Theriaque D, Burns S, Sherrill L (2006). The gluten-free, casein-free diet in autism: results of a preliminary double blind clinical trial. *J Autism Dev Disord* 36: 413–420.
- El-Fishawy P, State MW (2010). The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *Psychiatr Clin North Am* 33: 83–105.
- El-Rashidy O, El-Baz F, El-Gendy Y, Khalaf R, Reda D, Saad K (2017). Ketogenic diet versus gluten free casein free diet in autistic children: a case-control study. *Metab Brain Dis* 32: 1935–1941.
- Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcín C, Montiel-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C, Yasamy MT, Fombonne E (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* 5: 160–179.
- Erić-Nikolić A, Matić IZ, Dorđević M, Milovanović Z, Marković I, Džodić R, Inić M, Srdić-Rajić T, Jevrić M, Gavrilović D, Cordero OJ, Juranić ZD (2011). Serum DPPiV activity and CD26 expression on lymphocytes in patients with benign or malignant breast tumors. *Immunobiology* 216: 942–946.
- Farley M, McMahon W, Fombonne E, Jenson WR, Miller J, Gardner M, Block H, Pingree CB, Ritvo ER, Ritvo RA, Coon H (2009). Twenty-year outcome for individuals with autism and average or near-average cognitive abilities. *Autism Res* 2: 109–118.

- Farley M, Cottle KJ, Bilder D, Viskochil J, Coon H, McMahon W (2018). Mid-life social outcomes for a population-based sample of adults with ASD. *Autism Res* 11: 142–152.
- Fava M, Mischoulon D (2009) Folate in depression: efficacy, safety, differences in formulations, and clinical issues. *J Clin Psychiatry* 70: 12–17.
- Ferguson BJ, Dovgan K, Severns D, Martin S, Marler S, Gross Margolis K, Bauman ML, Veenstra-VanderWeele J, Sohl K, Beversdorf DQ (2019). Lack of Associations Between Dietary Intake and Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry* 25: 528.
- Fiedorowicz E, Kaczmarek M, Cieślińska A, Sienkiewicz-Szłapka E, Jarmołowska B, Chwała B, Kostyra E (2014). B-casomorphin-7 alters U-opioid receptor and dipeptidyl peptidase IV genes expression in children with atopic dermatitis. *Peptides* 62: 144–149.
- Findling RL, Maxwell K, Scotese-Wojtila L, Huang J, Yamashita T, Wiznitzer M (1997). High-dose pyridoxine and magnesium administration in children with autistic disorder: An absence of salutary effects in a double-blind, placebo-controlled study. *J Autism Dev Disord* 27: 467–78.
- Flaherty DK (2011). The Vaccine-autism connection: a public health crisis caused by unethical medical practices and fraudulent science. *Ann Pharmacother* 45: 1302–1304.
- Fombonne E (2005a). Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J Clin Psychiatry* 66(Supl 10): 3–8.
- Fombonne E (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res* 65: 591–598.
- Fombonne E. (2005b). The changing epidemiology of autism. *J Appl Res Intellect Disabil* 18: 281–294.
- Fombonne E, Quirke S, Hagen A (2011). *Epidemiology of pervasive developmental disorders*. En: Amaral DG, Dawson G, Geschwind DH, eds. Autism spectrum disorders; pp: 90–111. New York: Oxford University Press.
- Fond G, Boukouaci W, Chevalier G, Regnault A, Eberl G, Hamdani N, Dickerson F, Macgregor A, Boyer L, Dargel A, Oliveira J, Tamouza R, Leboyer M (2015). The “psychomicrobiotic”: Targeting microbiota in major psychiatric disorders: A systematic review. *Pathol Biol (Paris)* 63: 35–42.
- Foss I, Hagberg B, Trygstad O (1985). Chromatographic profiles at E-280 nm for urinary precipitates in morbus Rett. *Brain Dev* 7: 345–348.
- Foster E, Bradley J (2018). Methodological considerations and future insights for 24-hour dietary recall assessment in children. *Nutr Res* 51: 1–11.
- Fowlie G, Cohen N, Ming X (2018). The Perturbance of Microbiome and Gut-Brain Axis in Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci* 19: 2251.

- Gannage J (2010). Integrative autism treatment: fortelling medicine's future. *J orthomol Med* 25: 166–168.
- Geier DA, Kern JK, Geier MR (2014). A Comparison of the Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) and the Childhood Autism Rating Scale (CARS) for the Quantitative Evaluation of Autism. *J Ment Health Res Intellect Disabil* 6: 255–267.
- Genuis SJ, Bouchard TP (2010). Celiac disease presenting as autism. *J Child Neurol* 25: 114–119.
- Ghalichi F, Ghaemmaghami J, Malek A, Ostadrahimi A (2016). Effect of gluten free diet on gastrointestinal and behavioral indices for children with autism spectrum disorders: a randomized clinical trial. *World J Pediatr* 12: 436–442.
- Ghanizadeh A, Moghimi-Sarani E (2013). A randomized double blind placebo controlled clinical trial of N-Acetylcysteine added to risperidone for treating autistic disorders. *BMC Psychiatry* 13: 196.
- Gillberg C, Schaumann H (1981). Infantile autism and puberty. *J Autism Dev Disord* 11: 365–371.
- Gilberg C, Trygstad O, Foss I (1982). Childhood psychosis and urinary excretion of peptides and protein-associated peptide complexes. *J Autism Dev Disord* 12: 229–241.
- Gilroy JJ, Ferrier IN, Crow TJ, Rowell FJ (1990). Urinary chromatographic profiles in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 27: 1127–1132.
- Gizachew A, Teha J, Birhanu T (2014). Review on medicinal and nutritional values of camel milk. *Nat Sci* 12: 35–40.
- Glissen Brown JR, Singh P (2018). Coeliac disease. *Paediatr Int Child Health* 39: 23–31.
- Gogou M, Kolios G (2017). The effect of dietary supplements on clinical aspects of autism spectrum disorder: A systematic review of the literature. *Brain Dev* 39: 656–664.
- Goodwin MS, Cowen MA, Goodwin TC (1971). Malabsorption and cerebral dysfunction: a multivariate and comparative study of autistic children. *J Autism Child Schizophr* 1: 48–62.
- Grafodatskaya D, Chung B, Szatmarin P, Weksberg R (2010). Autism spectrum disorders and epigenetics. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49: 794–809.
- Grandjean P, Landrigan PJ (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 368: 2167–2178.
- Grimaldi R, Cela D, Swann JR, Vulevic J, Gibson GR, Tzortzis G, Costabile A (2017). In vitro fermentation of B-GOS: impact on faecal bacterial populations and metabolic activity in autistic and non-autistic children. *FEMS Microbiol Ecol*: 93.

- Grimaldi R, Gibson GR, Vulevic J, Giallourou N, Castro-Mejía JL, Hansen LH, Leigh Gibson E, Nielsen DS, Costabile A (2018). A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome* 6: 133.
- Hallbook T, Sjolander A, Amark P, Miranda M, Bjurulf B, Dahlin M (2015). Effectiveness of the ketogenic diet used to treat resistant childhood epilepsy in Scandinavia. *Eur J Paediatr Neurol* 19: 29–36.
- Haq MRU, Kapila R, Sharma R, Saliganti V, Kapila S (2014). Comparative evaluation of cow  $\beta$ -casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *Eur J Nutr* 53: 1039–1049.
- Hardan AY, Fung LK, Libove RA, Obukhanych TV, Nair S, Herzenberg LA, Frazier TW, Tirouvanziam (2012). A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. *Biol Psychiatry* 71: 956–961.
- Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosia C (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G996–G1003.
- Hediguer ML, England LJ, Molloy CA, Yu KF, Manning-Courtney P, Mills JL (2008). Reduced bone cortical thickness in boys with autism or autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 38: 848–856.
- Hendren RL, James SJ, Widjaja F, Lawton B, Rosenblatt A, Bent S (2016). Randomized, placebo-controlled trial of methyl B12 for children with autism. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 26: 774–783.
- Henschen A, Lottspeich F, Brantl V, Teschemacher H (1979). Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360: 1217–1224.
- Herbert MR (2010). Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 23: 103–110.
- Herbert MR, Buckley JA (2013a). Autism and dietary therapy: case report and review of the literature. *J Child Neurol* 28: 975–982.
- Herbert MR, Weintraub K, eds (2013b). *The Autism Revolution: Whole-Body Strategies for Making Life All It Can Be*; 1<sup>st</sup> ed. New York: Ballantine Books.
- Herndon AC, Di Guiseppi C, Johnson SL, Leiferman J, Reynolds A (2009). Does nutritional intake differ between children with autism spectrum disorders and children with typical development? *J Autism Dev Disord* 39: 212–222.
- Hertz-Picciotto I, Croen LA, Hansen R, Jones CR, van de Water J, Pessah IN (2006). The CHARGE study: an epidemiologic investigation of genetic and environmental factors contributing to autism. *Environ Health Perspect* 114: 1119–1125.



- Hertz-Picciotto I, Schmidt RJ, Walker CK, Bennett DH, Oliver M, Shedd-Wise KM, LaSalle JM, Giulivi C, Puschner B, Thomas J, Roa DL, Pessah IN, Van de Water J, Tancredi DJ, Ozonoff S (2018). A prospective study of environmental exposures and early biomarkers in autism spectrum disorder: Design, protocols, and preliminary data from the MARBLES study. *Environ Health Perspect* 126.
- Holmes AS, Blaxill MF, Haley BE (2003). Reduced level of mercury in first baby haircuts of autistic children. *Int J Toxicol* 22: 277–285.
- Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg EJ, Horvath K, Murray JA, Pivor M, Seidman EG (2005). Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American society for paediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 40: 1–19.
- Hirsch LE, Pringsheim T (2016). Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst Rev* 6.
- Host A, Halken S (2014). Cow's milk allergy: where have we come from and where are we going? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 14: 2–8.
- Hsu CL, Lin CY, Chen CL, Wang CM, Wong MK (2009). The effects of a gluten and casein-free diet in children with autism: a case report. *Chang Gung Med J* 32: 459–465.
- Hunter LC, O'Hare A, Herron WJ, Fisher LA, Jones GE (2003). Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Dev Med Child Neurol* 45: 121–128.
- Hyman SL, Stewart PA, Foley J, Cain U, Peck R, Morris DD, Wang H, Smith T (2016). The gluten-free/casein-free diet: a double-blind challenge trial in children with autism. *J Autism Dev Disord* 46: 205–220.
- Igbinedion SO, Ansari J, Vasikaran A, Gavins FN, Jordan P, Boktor M, Alexander JS (2017). Non-celiac gluten sensitivity: All wheat attack is not celiac. *W J Gastroenterol* 23: 7201–7210.
- Irvin DS (2006). Using analog assessment procedures for determining the effects of a gluten-free and casein-free diet on rate of problem behaviors for an adolescent with autism. *Behav Interv* 21: 281–286.
- Israngkun PP, Newman HA, Patel ST, Duruibe VA, Abou-Issa H (1986). Potential biochemical markers for infantile autism. *Neurochem Pathol* 5: 51–70.
- Jafari T, Rostampour N, Fallah AA, Hessami A (2017). The association between mercury levels and autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol* 44: 289–297.
- James SJ, Melnyk S, Fuchs G, Reid T, Jernigan S, Pavliv O, Hubanks A, Gaylor DW (2009) Efficacy of methylcobalamin and folinic acid treatment on glutathione redox status in children with autism. *Am J Clin Nutr* 89: 425–430.

- Jarmolowska B, Bukalo M, Fiedorowicz E, Cieślińska A, Kordulewska NK, Moszyńska M, Świętecki A, Kostyra E (2019). Role of Milk-Derived Opioid Peptides and Proline Dipeptidyl Peptidase-4 in Autism Spectrum Disorders. *Nutrients* 11: 87.
- Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC (2004). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 113: 832–836.
- Johnson CR, Handen BL, Zimmer M, Sacco K, Turner K (2011). Effects of gluten free/casein free diet in young children with autism: a pilot study. *J Dev Phys Disabil* 23: 213–225.
- Johnson SB, Silverstein J, Rosenbloom A, Carter R, Cunningham W (1986). Assessing daily management in childhood diabetes. *Health Psychology* 5: 545–564.
- Kaluzna-Czaplinska J, Blaszczyk S (2012). The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. *Nutrition* 28: 124–126.
- Kalyva E (2009). Comparison of eating attitudes between adolescent girls with and without Asperger Syndrome: Daughters' and mothers' reports. *J Autism Dev Disord* 39: 480–486.
- Kamiński S, Cieslińska A, Kostyra E (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet* 48: 189-198.
- Kanner L (1971). Follow-up study of eleven autistic children originally reported in 1943. *J Autism Child Schizophr* 1: 119–145.
- Kavale KA, Forness SR (1983). Hyperactivity and diet treatment: a meta-analysis of the Feingold hypothesis. *J Learn Disabil* 16: 324–330
- Kern JK, Miller VS, Cauller PL, Kendall PR, Mehta PJ, Dodd M (2001). Effectiveness of N-dimethylglycine in autism and pervasive developmental disorder. *J Child Neurol* 16: 169–173.
- Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Haley BE, Geier MR (2016). The relationship between mercury and autism: A comprehensive review and discussion. *J Trace Elem Med Biol* 37: 8–24.
- Khan A, Harney JW, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM (2014). Disrupted brain thyroid hormone homeostasis and altered thyroid hormone-dependent brain gene expression in autism spectrum disorders. *J Physiol Pharmacol* 65: 257–272.
- Kitts A, Sherry S (2002). *The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation*. En: McEntyre J, Ostell J, eds. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology In-



formation (US) Capítulo 5. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21088/>.

- Knivsberg AM, Reichelt KL, Høien T, Nødland M (2002). A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutr Neurosci* 5: 251–261.
- Knivsberg AM, Reichelt KL, Høien T, Nødland M (2003). Effect of dietary intervention on autistic behavior. *Focus Autism Dev Dis* 18: 247–256.
- Knivsberg AM, Reichelt KL, Nødland M (1999). Dietary intervention for a seven year old girl with autistic behaviour. *Nutr Neurosci* 2: 435–439.
- Knivsberg AM, Reichelt KL, Nødland M (2001). Reports on dietary intervention in autistic disorders. *Nutr Neurosci* 4: 25–37.
- Knivsberg AM, Reichelt KL, Nødland M, Høien T (1995). Autistic syndromes and diet: a follow-up study. *Scand J Educ Res* 39: 223–236.
- Knivsberg AM, Wiig K, Lind G, Nødland M, Reichelt KL (1990). Dietary intervention in autistic syndromes. *Brain Dysfunct* 3: 315–317.
- Konstantynowicz J, Nguyen TV, Kaczmarek M, Jamiolkowski J, Piotrowska-Jastrzebska J, Seeman E (2007). Fractures during growth: potential role of a milk-free diet. *Osteoporos Int* 18: 1601–1607.
- Kost NV, Sokolov OY, Kurasova OB, Dmitriev AD, Tarakanova JN, Gabaeva MV, Zolotarev YA, Dadayan AK, Grachev SA, Korneeva EV, Mikheeva IG, Zozulya AA (2009). Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides* 30: 1854–1860.
- Kumar P, O’Donoghue P, Stenson K, Dawson A (1979). Reintroduction of gluten in adults and children with treated celiac disease. *Gut* 20: 743–749.
- Kurek M, Rueff F, Czerwionka-Szaflarska M, Doroszewska G, Przybilla B (1996). Exorphins derived from cow’s milk casein elicit pseudo-allergic wheal-and-flare reactions in healthy children. *French Rev Allergol Clin Immunol* 36: 191–196.
- Kushak RI, Lauwers GY, Winter HS, Buie TM (2011). Intestinal disaccharidase activity in patients with autism: effect of age, gender, and intestinal inflammation. *Autism* 15: 285–294.
- Lacroix IM, Li-Chan EC (2014). Investigation of the putative associations between dairy consumption and incidence of type 1 and type 2 diabetes. *Crit Rev Food Sci* 54: 411–432.
- Lai MC, Lombardo MV, Auyeung B, Chakrabarti B, Baron-Cohen S (2015). Sex/gender differences and autism: setting the scene for future research. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 54: 11–24.
- Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S (2014). Autism. *Lancet* 383: 896–910.

- Landa RJ, Holman KC, Garrett-Mayer E (2007). Social and communication development in toddlers with early and later diagnosis of autism spectrum disorders. *JAMA Psychiatry* 64: 853–864.
- Lange KW, Hauser J, Reissmann A (2015). Gluten-free and casein-free diets in the therapy of autism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18: 572–575.
- Lau NM, Green PH, Taylor AK, Hellberg D, Ajamian M, Tan CZ, Kosofsky BE, Higgins JJ, Rajadhyaksha AM, Alaedini A (2013). Markers of celiac disease and gluten sensitivity in children with autism. *PLoS ONE* 8.
- Lázaro CP, Pondé MP, Rodrigues LE (2016). Opioid peptides and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorders. *Rev Bras Psiquiatr* 38: 243–246.
- Leboyer M, Bouvard MP, Launay JM, Recasens C, Plumet MH, Waller-Perotte D (1993). Opiate hypothesis in infantile autism? Therapeutic trials with naltrexone. *Encephale* 9: 95–102.
- Le Menn-Tripi C, Vachaud A, Defas N, Malvy J, Roux S, Bonnet-Brilhault F (2019). Sensory-psychomotor evaluation in autism: a new tool for functional diagnosis. *Encephale* 45: 312–319.
- Liu KY, King M, Bearman PS (2010). Social influence and the autism epidemic. *AJS* 115: 1387–1434.
- Liu YW, Liong MT, Chung YCE, Huang HY, Peng WS, Cheng YF, Lin YS, Wu YY, Tsai YC (2019a). Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on children with autism spectrum disorder in Taiwan: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients* 11: 820.
- Liu J, Wan GB, Huang MS, Agyapong G, Zou TL, Zhang XY, Liu YW, Song YQ, Tsai YC, Kong XJ (2019b). Erratum to: Probiotic therapy for treating behavioural and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder; a systematic review of clinical trials. *Curr Med Sci* 39: 512.
- Liu J, Wan GB, Huang MS, Agyapong G, Zou TL, Zhang XY, Liu YW, Song YQ, Tsai YC, Kong XJ (2019c). Probiotic therapy for treating behavioural and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder; a systematic review of clinical trials. *Curr Med Sci* 39: 173–184.
- Lord C, Rutter M, Goode S, Heemsbergen J, Jordan H, Mawhood L, Schopler E (1989). Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J Autism Dev Disord* 19: 185–212.
- Loth E, Spooren W, Ham LM, Isaac MB, Auriche-Benichou C, Banaschewski T, Baron-Cohen S, Broich K, Bolte S, Bourgeron T, Charman T, Collier D, de Andres-Trelles F, Durston S, Ecker C, Elferink A, Haberkamp M, Hemmings R, Johnson MH, Jones EJ, Khwaia OS, Lenton S, Mason L, Mantua V, Meyer-Lindenberg A, Lombardo MV, O'Dwyer L, Okamoto K, Pandina GJ, Pani J, Vamvakas S, Williams S, Buitelaar JK, Murphy DG (2016). Identification and

- validation of biomarkers for autism spectrum disorders. *Nat Rev Drug Discov* 15: 70–73.
- Lucarelli S, Frediani T, Zingoni AM, Ferruzzi F, Giardini O, Quintieri F, Barbato M, D'Eufemia P, Cardì E (1995). Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med* 37: 137–141.
- Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Leffler DA, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 62: 43–52.
- Ly V, Bottelier M, Hoekstra PJ, Arias Vasquez A, Buitelaar JK, Rommelse NN (2017). Elimination diets' efficacy and mechanisms in attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 26: 1067–1079.
- MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW (2013). The database of genomic variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 29. Recuperado de: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>.
- Maestro S, Casella C, Milone A, Muratori F, Palacio-Espasa F (1999). Study of the onset of autism through home movies. *Psychopathology* 32: 292–300.
- Mahapatra S, Vyshedsky D, Martinez S, Kannel B, Braverman J, Edelson SM, Vyshedskiy A (2018). Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) Norms: A "Growth Chart" for ATEC Score Changes as a Function of Age. *Children (Basel)* 5: 25.
- Mangiola F, Laniro G, Franceschi F, Fagioli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol* 22: 361–368.
- Marí-Bauset S, Llopis-González A, Zazpe I, Marí-Sanchis A, Suárez-Varela MM (2016). Nutritional impact of a gluten-free casein-free diet in children with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 46: 673–684.
- Marí-Bauset S, Zazpe I, Mari-Sanchis A, Llopis-González A, Morales-Suárez-Varela M (2014). Evidence of the gluten-free and casein-free diet in autism spectrum disorders: a systematic review. *J Child Neurol* 29: 1–10.
- Margolis KG, Buie TM, Turner JB, Silberman AE, Feldman JF, Murray KF, McSwiggan-Hardin M, Levy J, Bauman ML, Veenstra-VanderWeele J, Whitaker AH, Winter HS (2019). Development of a Brief Parent-Report Screen for common gastrointestinal disorders in Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord* 49: 349.
- Martineau J, Barthelemy C, Garreau B, Lelord G (1985). Vitamin B6, magnesium, and combined B6-Mg: therapeutic effects in child- hood autism. *Biol Psychiatry* 20: 467–78.

- Martins Y, Young RL, Robson DC (2008). Feeding and eating behaviors in children with autism and typically developing children. *J Autism Dev Disord* 38: 1878–1887.
- Mazahery H, Conlon CA, Beck KL, Mugride O, Kruger MC, Stonehouse W, Camargo CA Jr, Meyer BJ, Jones B, von Hurst PR (2019a). A randomised-controlled trial of vitamin D and Omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in the treatment of irritability and hyperactivity among children with autism spectrum disorder. *Steroid Biochem Mol Biol* 187: 9–16.
- Mazahery H, Conlon CA, Beck KL, Mugride O, Kruger MC, Stonehouse W, Camargo CA Jr, Meyer BJ, Tsang B, Jones B, von Hurst PR (2019b). A randomised-controlled trial of vitamin D and Omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in the treatment of core symptoms of autism spectrum disorder in children. *J Autism Dev Disord* 49: 1778–1794.
- Metcalf DD, Sampson HA (1990). Workshop on experimental methodology for clinical studies of adverse reactions to foods and food additives. *J Allergy Clin Immunol* 86: 421–442.
- McCarthy DM, Coleman M (1979). Response of intestinal mucosa to gluten challenge in autistic subjects. *Lancet* 2: 877–878.
- McCaulley ME (2019). Autism spectrum disorder and mercury toxicity: use of genomic and epigenetic methods to solve the etiologic puzzle. *Acta Neurobiol Exp* 79: 113–125.
- McElhanon BO, McCracken C, Karpen S, Sharp WG (2014). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Pediatrics* 133: 872–883.
- Miller D (2016). Maybe It's Not the Gluten. *JAMA Intern Med* 176: 1717–1718.
- Millward C, Ferriter M, Calver S, Connell-Jones G (2008). Gluten and casein free diets for autistic spectrum disorder. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Millward C, Ferriter M, Calver SJ, Connell-Jones GG (2019). WITHDRAWN: Gluten- and casein-free diets for autistic spectrum disorder. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Minshawi NF, Wink LK, Shaffer R, Plawecki MH, Posey DJ, Liu H, Hurwitz S, McDougle CJ, Swiezy NB, Erickson CA (2016). A randomized, placebo-controlled trial of D-cycloserine for the enhancement of social skills training in autism spectrum disorders. *Mol Autism* 7: 2.
- Mogul D, Nakamura Y, Seo J, Blauvelt B, Bridges JF (2017). The unknown burden and cost of celiac disease in the U.S. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 17: 181–188.
- Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, Eggersdorfer M (2018). The role of the microbiome for human health: From basic science to clinical applications. *Eur J Nutr* 57(Supl 1): 1–14.

- Molina-Infante J, Carroccio A (2017). Suspected Nonceliac Gluten Sensitivity Confirmed in Few Patients After Gluten Challenge in Double-Blind, Placebo-Controlled Trials. *Clin Gastroenterol Hepatol* 15: 339–348.
- Monti G, Libanore V, Marinaro L, Lala R, Miniero R, Savino F (2007). Multiple bone fracture in an 8 years old child with cow's milk allergy and inappropriate calcium supplementation. *Ann Nutr Metab* 51: 228–231.
- Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I (2004). The genetics of autism. *Pediatrics* 113: e472–486.
- Mulloy A, Lang R, O'Reilly M, Sigafos J, Lancioni G, Rispoli M (2010). Gluten-free and casein-free diet in the treatment of autism spectrum disorders: a systematic review. *Res Autism Spectr Disord* 4: 328–339.
- Munasinghe SA, Oliff C, Finn J, Wray JA (2010). Digestive enzyme supplementation for autism spectrum disorders: a double-blind randomized controlled trial. *J Autism Dev Disord* 40: 1131–1138.
- Muraro MA, Giampietro PG, Galli E (2002). Soy formulas and nonbovine milk. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89(Supl 1): 97–101.
- Mychasiuk R, Rho JM (2017). Genetic modifications associated with ketogenic diet treatment in the BTBRT+ Tf/J mouse model of autism spectrum disorder. *Autism Res* 10: 456–471.
- Nadeau KC, Schneider LC, Hoyte L, Borrás I, Umetsu DT (2011). Rapid oral desensitization in combination with omalizumab therapy in patients with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 127: 1622–1624.
- Napoli E, Duenas N, Giulivi C (2014). Potential therapeutic use of ketogenic diet in autism spectrum disorders. *Front Pediatr* 2: 1–9.
- Navarro E, Araya M (2015). Non-celiac gluten sensitivity: Another condition that responds to gluten. *Rev Med Chil* 143: 619–626.
- Navarro F, Pearson DA, Fatheree N, Mansour R, Hashmi SS, Rhoads JM (2015). Are 'leaky gut' and behavior associated with gluten and dairy containing diet in children with autism spectrum disorders? *Nutr Neurosci* 18: 177–185.
- Neumeyer AM, Gates A, Ferrone C, Lee H, Misra M (2013). Bone density in peripubertal boys with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 43: 1623–1629.
- Newell C, Bomhof MR, Reimer RA, Hittel DS, Rho JM, Shearer J (2016). Ketogenic diet modifies the gut microbiota in a murine model of autism spectrum disorder. *Mol Autism* 7: 1–6.
- Nikoo M, Radnia H, Farokhnia M, Mohammadi MR, Akhondzadeh S (2015). N-acetylcysteine as an adjunctive therapy to risperidone for treatment of irritability in autism: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of efficacy and safety. *Clin Neuropharmacol* 38: 11–17.

- Nordahl CW, Lange N, Li DD, Barnett LA, Lee A, Buonocore MH, Simon TJ, Rogers S, Ozonoff S, Amaral DG (2011). Brain enlargement is associated with regression in preschool-age boys with autism spectrum disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 20195–20200.
- Nygaard HA (2010). Pain in people with dementia and impaired verbal communication. *J Pain Palliat Care Pharmacother* 24: 414–426.
- Oneal BJ, Reeb RN, Korte JR, Butter EJ (2006). Assessment of home-based behavior modification programs for autistic children: reliability and validity of the behavioral summarization evaluation. *J Prev Interv Community* 32: 25–39.
- Owen-Smith AA, Bent S, Lynch FL, Coleman KJ, Yau VM, Pearson KA, Massolo ML, Quinn V, Croen LA (2015). Prevalence and predictors of complementary and alternative medicine use in a large insured sample of children with autism spectrum disorders. *Res Autism Spectr Disord* 17: 40–51.
- Organización Mundial de la Salud: CIE-10. *Trastornos Mentales y del Comportamiento. Décima Revisión de la Clasificación Internacional de las Enfermedades. Descripciones Clínicas y pautas para el diagnóstico*. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1992.
- Pacharn P, Vichyanond P (2017). Immunotherapy for IgE-mediated Wheat allergy. *Hum Vaccin Immunother* 13: 2462–2466.
- Pal S, Woodford K, Kukuljan S, Ho S (2015). Milk intolerance, beta-casein and lactose. *Nutrients* 7: 7285–7297.
- Panda S, Guarner F, Manichanh C (2014). Structure and functions of the gut microbiome. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 14: 290–299.
- Panksepp JA (1979). A neurochemical theory of autism. *Trends Neurosci* 2: 174–177.
- Parellada M, Llorente C, Calvo R, Gutierrez S, Graell M, Guisasola M, Dorado ML, Boada L, Romo J, Dulin E, Sanz I, Arango C, Moreno C (2017). Randomized trial of omega-3 for autism spectrum disorders: Effect on cell membrane composition and behaviour. *Eur Neuropsychopharmacol* 27: 1319–1330.
- Parracho H, Gibson GR, Knott F, Bosscher D, Kleerebezem M, McCartney A (2010). A double-blind, placebo-controlled, crossover-designed probiotic feeding study in children diagnosed with autistic spectrum disorders. *Int J Probiotics and Prebiotics* 5: 69–74.
- Pedersen L, Parlar S, Kvist K, Whiteley P, Shattock P (2014). Data mining the ScanBrit study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders: behavioural and psychometric measures of dietary response. *Nutr Neurosci* 17: 207–213.
- Pennesi CM, Klein LC (2012). Effectiveness of the gluten-free, casein-free diet for children diagnosed with autism spectrum disorder: Based on parental report. *Nutr Neurosci* 15: 85–91.



- Penzol MJ, Salazar de Pablo G, Llorente C, Moreno C, Hernández P, Dorado ML, Parellada M (2019). Functional gastrointestinal disease in autism spectrum disorder: a retrospective descriptive study in a clinical sample. *Front Psychiatry* 10: 179.
- Perrin JM, Coury DL, Hyman SL, Cole L, Reynolds AM, Clemons T (2012). Complementary and alternative medicine use in a large pediatric autism sample. *Pediatrics* 130 (Supl 2): 77–82.
- Piowowarczyk A, Horvath A, Łukasik J, Pisula E, Szajewska H (2018). Gluten- and casein-free diet and autism spectrum disorders in children: a systematic review. *Eur J Nutr* 57: 433–440.
- Pompili M, Longo L, Dominici G, Serafini G, Lamis DA, Sarris J, Amore M, Girardi P (2017). Polyunsaturated fatty acids and suicide risk in mood disorders: A systematic review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 6: 43–56.
- Posar A, Visconti P (2017). Autism in 2016: the need for answers. *J Pediatr (Rio J)* 93: 111–119.
- Posey DJ, Kem DL, Swiezy NB, Sweeten TL, Wiegand RE, McDougale CJ (2004). A pilot study of D-cycloserine in subjects with autistic disorder. *Am J Psychiatry* 161: 2115–2117.
- Purcell AE, Jeon OH, Zimmerman AW, Blue ME, Pevsner J (2001). Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. *Neurol* 57: 1618–1628.
- Pusponegoro HD, Ismael S, Firmansyah A, Sastroasmoro S, Vandenplas Y (2015a). Gluten and casein supplementation does not increase symptoms in children with autism spectrum disorder. *Acta Paediatr* 104: 500–505.
- Pusponegoro HD, Ismael S, Sastroasmoro S, Firmansyah A, Vandenplas Y (2015b). Maladaptive Behavior and Gastrointestinal Disorders in Children with Autism Spectrum Disorder. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 18: 230–237.
- Rai V (2016). Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism with autism: Evidence of genetic susceptibility. *Metab Brain Dis* 31: 727.
- Ramaekers V, Häusler M, Opladen T, Heimann G, Blau N (2002). Psychomotor retardation, spastic paraplegia, cerebellar ataxia and dyskinesia associated with low 5-methyltetrahydrofolate in cerebro-spinal fluid: a novel neurometabolic condition responding to folinic acid substitution. *Neuropediatrics* 33: 301–308.
- Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, Lloyd DJ, Dean JC (2005). Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol* 47: 551–555.

- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschemdorf F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A part 1* 140: 2063–2074.
- Reichelt KL, Hole K, Hamberger A, Saelid G, Edminson PD, Braestrup CB, Lingjaerde O, Ledaal P, Orbeck H (1981). Biologically active peptide-containing fractions in schizophrenia and childhood autism. *Adv Biochem Psychopharmacol* 28: 627–643.
- Reichelt KL, Ekrem J, Scott H (1990). Gluten, milk proteins and autism: dietary intervention effects on behaviour and peptide secretion. *J Appl Nutr* 42: 1–11.
- Reichelt KL, Knivsberg AM (2003). Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutr Neurosci* 6: 19–28.
- Reichelt KL, Knivsberg AM, Lind G, Nødland M (1991). Probable etiology and treatment of childhood autism. *Brain Dysfunct* 4: 308–319.
- Reichelt KL, Saelid G, Lindback T, Boler JB (1986). Childhood autism: a complex disorder. *Biol Psychiatry* 21: 1279–1290.
- Reichelt KL, Tveiten D, Knivsberg AM, Bronstad G (2012). Peptide's role in autism with emphasis on exorphins. *Microb Ecol Health Dis* 23: 18958.
- Reichow B, Barton EE, Boyd BA, Hume K (2014). Early Intensive Behavioral Intervention (EIBI) for Young Children with Autism Spectrum Disorders (ASD): A Systematic Review. *Campbell Syst Rev* 9.
- Reyna N, Moreno-Rojas R, Mendoza L, Parra K, Linares S, Reyna E, Cámara-Martos F (2016). Utilización de las proteínas séricas y caseínas como suplementos dietéticos para la prolongación del efecto de saciedad en mujeres obesas. *Nutr Hosp* 33: 47–53.
- Rimland B (1971). The differentiation of childhood psychoses: an analysis of checklists for 2,218 psychotic children. *J Autism Child Schizophr* 1: 161–174.
- Rimland B, Edelson M (1999). Autism Treatment Evaluation Checklist. Autism Research Institute, San Diego.
- Robertson MA, Sigalet DL, Holst J, Meddings JB, Wood J, Sharkey KA (2008). Intestinal permeability and glucagon-like peptide-2 in children with autism: controlled pilot study. *J Autism Dev Disord* 38: 1066–1071.
- Rubenstein E, Schieve L, Bradley C, DiGuiseppi C, Moody E, Thomas K, Daniels J (2018). The prevalence of gluten free diet use among preschool children with autism spectrum disorder. *Autism Res* 11: 185–193.
- Ruskin DN, Svedova J, Cote JL, Sandau U, Rho JM, Kawamura Jr M, Boison D, Masino SA (2013). Ketogenic diet improves core symptoms of autism in BTBR mice. *PLoS ONE* 8.



- Rutter M, Le Couteur A, Lord C (2003) *Autism diagnostic interview-revised manual*. Western Psychological Services, Los Angeles.
- Saad K, Eltayeb AA, Mohamad IL, Al Atram AA, Elserogy Y, Bjørklund G, El-Houfey AA, Nicholson B (2015). A randomized, placebo-controlled trial of digestive enzymes in children with autism spectrum disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 13: 188–193.
- Sacco R, Curatolo P, Manzi B, Militerni R, Bravaccio C, Frolli A, Lenti C, Saccani M, Elia M, Reichelt KL, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Persico AM (2010). Principal pathogenetic components and biological endophenotypes in autism spectrum disorders. *Autism Res* 3: 237–252.
- Salomone E, Charman T, McConachie H, Warreyn P (2015). Working group 4, COST action “Enhancing the Scientific Study of Early Autism”: prevalence and correlates of use of complementary and alternative medicine in children with autism spectrum disorder in Europe. *Eur J Pediatr* 174: 1277–1285.
- Sander I, Merget R, Degens PO, Goldscheid N, Brüning T, Raulf-Heimsoth M (2004). Comparison of wheat and rye flour skin prick test solutions for diagnosis of baker's asthma. *Allergy* 59: 95–98.
- Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, Stefanile R, Mazzarella G, Tolone C, Russo MI, Esposito P, Ferraraccio F, Cartenì M, Riegler G, de Magistris L, Fasano A (2011). Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med* 9: 23.
- Sathe N, Andrews JC, McPheeters ML, Wharren ZE (2017). Nutritional and Dietary Interventions for Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Pediatrics* 139.
- Schopler E, Reichler RJ, DeVellis RF, Daly K (1980). Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *J Autism Dev Disord* 10: 91–103.
- Schulmeister U, Hochwallner H, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Geller B, Nystrand M, Härlin A, Thalhamer J, Scheiblhofer S, Keller W, Niggemann B, Quirce S, Ebner C, Mari A, Pauli G, Herz U, Valenta R, Spitzauer S (2009). Cloning, expression, and mapping of allergenic determinants of alphaS1-casein, a major cow's milk allergen. *J Immunol* 182: 7019–7029.
- Schünemann H, Brozek J, Guyatt G, Oxman A (2013). *Handbook for grading the quality of evidence and the strength of recommendations using the GRADE approach*. Disponible en <https://gradepro.org> > cite
- Seller M (1994). Vitamins, folic acid and the cause and prevention of neural tube defects. *Ciba Found Symp* 181: 161–173.
- Seroussi K (2002). *Unraveling the mystery of autism and pervasive developmental disorder: A mother's story of research & recovery*. New York: Crown.

- Seung HK, Rogalski Y, Shankar M, Elder J (2007). The gluten- and casein-free diet and autism: communication outcomes from a preliminary double-blind clinical trial. *J Med Speech-Lang Pa* 15: 337–339.
- Shaaban SY, El Gendy YG, Mehanna NS, El-Senousy WM, El-Feki HSA, Saad K, El-Asheer OM (2018). The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutr Neurosci* 21: 676–681.
- Shattock P, Whiteley P (2002). Biochemical aspects in autism spectrum disorders: updating the opioid-excess theory and presenting new opportunities for biomedical intervention. *Expert Opin Ther Targets* 6: 175–183.
- Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ, Delwiche LD, Schmidt RJ, Ritz B, Hansen RL, Hertz-Picciotto I (2014). Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environ Health Perspect* 122: 1103–1109.
- Shulkin ML, Pimpin L, Bellinger D, Kranz S, Duggan C, Fawzi W (2016). Effects of omega-3 supplementation during pregnancy and youth on neurodevelopment and cognition in childhood: a systematic review and meta-analysis. *FASEB J* 30 (Supl 1): 295.
- Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahey JW, Talalay P, Zimmerman AW (2014). Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 15550–15555.
- Sinya H (2015). *La enzima prodigiosa: una forma de vivir sin enfermar*. Madrid: Aguilar.
- Sokolov O, Kost N, Andreeva O, Korneeva E, Meshavkin V, Tarakanova Y, Dadayan A, Zolotarev Y, Grachev S, Mikheeva I, Varlamov O, Zozulya A (2014). Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides* 56: 68–71.
- Sonuga-Barke EJS, Brandeis D, Cortese S, Daley D, Ferrin M, Holtmann M, Stevenson J, Danckaerts M, van der Oort S, Dopfner M, Dittmann RW, Simonoff E, Zuddas A, Banaschewski T, Buitelaar J, Coghill D, Hollis C, Konofal E, Lecendreux M, Wong IC, Sergeant J, European ADHD Guidelines group (2013). Nonpharmacological interventions for ADHD: systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials of dietary and psychological treatments. *Am J Psychiatry* 170: 275–289.
- Srikantha P, Mohajeri MH (2019). The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci* 20: 2115.
- Steffenburg S, Steffenburg U, Gillberg C (2003). Autism spectrum disorders in children with active epilepsy and learning disability: comorbidity, pre and perinatal background, and seizure characteristics. *Dev Med Child Neurol* 45: 724–730.

- Sullivan PB (1997). Gastrointestinal problems in the neurologically impaired child. *Baillieres Clin Gastroenterol* 11: 529–546.
- Sun Z, Cade JR (1999a). A peptide found in schizophrenia and autism causes behavioral changes in rats. *Autism* 3: 85–95.
- Sun Z, Cade JR, Fregly MJ, Privette RM (1999b). B- Casomorphin induces Fos-Like immunoreactivity in discrete brain regions relevant to schizophrenia and autism. *Autism* 3: 67–83.
- Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z (2003). Relation of beta-casomorphins to apnea in sudden infant death syndrome. *Peptides* 24: 937–43.
- Tabatadze T, Zhorzholiani L, Kherkheulidze M, Kandelaki E, Ivanashvili T (2015). Hair heavy metal and essential trace element concentration in children with autism spectrum disorder. *Georgian Med News* 248: 77–82.
- Taniuchi S, Takahashi M, Soejima K, Hatano Y, Minami H (2017). Immunotherapy for cow's milk allergy. *Hum Vaccin Immunother* 13: 2443–2451.
- Teschemacher H (2003). Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr Pharm Des* 9: 1331–1344.
- Tolbert L, Haigler T, Waits MM, Dennis T (1993). Brief Report: Lack of response in an autistic population to a low dose clinical trial of pyridoxine plus magnesium. *J Autism Dev Disord* 23: 193–199.
- Trivedi MS, Hodgson NW, Walker SJ, Trooskens G, Nair V, Deth RC (2015). Epigenetic effects of casein-derived opioid peptides in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Nutr Metab (Lond)* 12: 54.
- Trudeau MS, Madden RF, Parnell JA, Gibbard WB, Shearer J (2019). Dietary and supplement-based complementary and alternative medicine use in pediatric autism spectrum disorder. *Nutr* 11.
- Trygstad OE, Reichelt KL, Foss I, Edminson PD, Saelid G, Bremer J, Hole K, Orbeck H, Johansen JH, Boler JB, Titlestad K, Opstad PK (1980). Patterns of peptides and protein-associated-peptide complexes in psychiatric disorders. *Br J Psychiatry* 136: 59–72.
- Tveiten D, Finvold A, Andersson M, Reichelt KL (2014). Peptides and exorphins in the autism spectrum. *O J Psych* 4: 275–287.
- Van De Sande MM, van Buul VJ, Brouns FJ (2014). Autism and nutrition: the role of the gut-brain axis. *Nutr Res Rev* 27: 199–214.
- Voigt RG, Mellon MW, Katusic SK, Weaver AL, Matern D, Mellon B, Jensen CL, Barbaresi WJ (2014). Dietary docosahexaenoic acid supplementation in children with autism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 58: 715–722.
- Vojdani A, O'Bryan T, Green JA, Mccandless J, Woeller KN, Vojdani E, Nourian AA, Cooper EL (2004). Immune response to dietary proteins, gliadin and cerebellar peptides in children with autism. *Nutr Neurosci* 7: 151–161.

- Volk HE, Hertz-Picciotto I, Delwiche L, Lurmann F, McConnell R (2011). Residential proximity to freeways and autism in the CHARGE study. *Environ Health Perspect* 119: 873–877.
- Volta U, Caio G, De Giorgio R, Henriksen C, Skodje G, Lundin KE (2015). Non-celiac gluten sensitivity: a work-in-progress entity in the spectrum of wheat-related disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 29: 477–491.
- Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, Berelowitz M, Dhillon AP, Thomson MA, Harvey P, Valentine A, Davies SE, Walker-Smith JA (1998). Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet* 351: 637–641.
- Wang L, Angley MT, Gerber JP, Young RL, Abarno DV, McKinnon RA, Sorich MJ (2009) Is urinary indolyl-3-acryloylglycine a biomarker for autism with gastrointestinal symptoms? *Biomarkers* 14: 596–603.
- Waye MMY, Cheng HY (2018). Genetics and epigenetics of autism: a review. *Psychiatry Clin Neurosci* 72: 228–244.
- West NP, Horn PL, Pyne DB, Gebiski VJ, Lahtinen SJ, Fricker PA, Cripps AW (2014). Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. *Clin Nutr* 33: 581–587.
- Whiteley P (2015). Nutritional management of (some) autism: a case for gluten- and casein-free diets? *Proc Nutr Soc* 74: 202–207.
- Whiteley P, Haracopos D, Knivsberg AM, Reichelt KL, Parlar S, Jacobsen J, Seim A, Pedersen L, Schondel M, Shattock P (2010a). The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr Neurosci* 13: 87–100.
- Whiteley P, Rodgers J, Savery D, Shattock P (1999). A gluten-free diet as an intervention for autism and associated spectrum disorders: preliminary findings. *Autism* 3: 45–65.
- Whiteley P, Shattock P (2002). Biochemical aspects in autism spectrum disorders: Updating the opioid-excess theory and presenting new opportunities for biomedical intervention. *Expert Opin Ther Targets* 6: 175–183.
- Whiteley P, Shattock P, Carr K, Hooper M, Todd L (2010b). How could a gluten and casein-free diet ameliorate symptoms associated with autism spectrum conditions? *Autism Insights* 2: 39–53.
- Whiteley P, Shattock P, Knivsberg AM, Seim A, Reichelt KL, Todd L, Carr K, Hooper M (2013). Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Front Hum Neurosci* 4: 344.
- Whyatt CP, Craig CM (2012). Motor skills in children aged 7-10 years, diagnosed with autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 42: 1799–1809.

- Wiśniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska BA (2019). Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder-current evidence in the field. *J Appl Genet* 60: 37–47.
- Wink LK, Adams R, Wang Z, Klaunig JE, Plawecki MH, Posey DJ, McDougle CJ, Erickson CA (2016). A randomized placebo-controlled pilot study of N-acetylcysteine in youth with autism spectrum disorder. *Mol Autism* 7: 26.
- Wong S, Giulivi C (2016). Autism, mitochondria and polybrominated diphenyl ether exposure. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 15: 614–623.
- Wright B, Pearce H, Allgar V, Miles J, Whitton C, Leon I, Jardine J, McCaffrey N, Smith R, Holbrook I, Lewis J, Goodall D, Alderson Day D (2012). A Comparison of Urinary Mercury between Children with Autism Spectrum Disorders and Control Children. *PLoS ONE* 7: 29547.
- Yui K, Koshiba M, Nakamura S, Kobayashi Y (2012). Effects of large doses of arachidonic acid added to docosahexaenoic acid on social impairment in individuals with autism spectrum disorders: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *J Clin Psychopharmacol* 32: 200–206.
- Zablotsky B, Black LI, Maenner MJ, Schieve LA, Blumberg SJ (2015). Estimated prevalence of autism and other developmental disabilities following questionnaire changes in the 2014 National Health Interview Survey. *Natl Health Stat Report* 13: 1–20.
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat neurosci* 17: 400–406.
- Zuidmeer L, Goldhahn K, Rona RJ, Gislason D, Madsen C, Summers C, Sodergren E, Dahlstrom J, Lindner T, Sigurdardottir ST, McBride D, Keil T (2008). The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 121: 1210–1218.



## ANEXOS





## ANEXO 1. INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO DE GRANADA



Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

D. Miguel Ángel Calleja Hernández Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Centro de Granada (CEI-GRANADA)

### CERTIFICA

Que este Comité ha analizado la propuesta de la Unidad Salud Mental Infanto Juvenil para que se realice el proyecto de investigación titulado: “Influencia de una dieta libre de gluten y caseína sobre las alteraciones del comportamiento en niños y adolescentes con trastornos del espectro autista” y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del proyecto en relación con los objetivos del estudio.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este centro.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por el Dr. Francisco Díaz Atienza como investigador principal en el mismo y colaboradores.

Lo que firmo en Granada a veintiseis de febrero de dos mil trece.



## ANEXO 2. FUENTES DE FINANCIACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN

En Madrid, a 20 de septiembre de 2013

### REUNIDOS

De una parte, Doña **JOSEFINA CASTRO FORNIELES**, mayor de edad, con NIF núm. [REDACTED] y domicilio a efectos del presente documento en [REDACTED]

Y de otra parte, Don **PABLO JOSÉ GONZÁLEZ DOMENECH**, mayor de edad, con NIF núm. [REDACTED] y domicilio a efectos del presente documento en la [REDACTED]

**INTERVIENEN:** Doña **JOSEFINA CASTRO FORNIELES** en nombre y representación de la **ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE PSIQUIATRÍA DEL NIÑO Y EL ADOLESCENTE**, en adelante AEPNYA, provista de CIF núm. G-79.148.516, domiciliada en la Calle Santa Isabel nº51 de Madrid, e inscrita en el Registro Nacional de Asociaciones con el nº 7685, desde el 24 de junio de 1968.

Don **PABLO JOSÉ GONZÁLEZ DOMENECH** lo hace en su propio nombre y derecho.

### EXPONEN:

I.- Que, con el fin de contribuir a la mejora de la investigación en el campo de la psiquiatría del niño y el adolescente, AEPNYA convocó una Beca para proyectos de Investigación eligiéndose por el jurado calificador, en el Congreso de AEPNYA celebrado en Granada el 17 de mayo de 2013, el proyecto ***“Influencia de una dieta libre de gluten y caseína sobre las alteraciones del comportamiento en niños y adolescentes con trastornos del espectro autista”*** presentado por D. Pablo José González Domenech.

II.- Que al objeto de llevar a cabo dicho proyecto ambas partes se reconocen mutua y recíprocamente capacidad legal para suscribir el presente **CONTRATO**, que se habrá de regir por las siguientes



## ESTIPULACIONES

### PRIMERA.- Objeto.

El presente contrato tiene por objeto la ejecución de trabajos de investigación por el becario D. Pablo José González Domenech, conforme al proyecto de investigación que se adjunta al presente contrato como Anexo I, formando parte integrante del mismo.

### SEGUNDA.- Plazo y condiciones de ejecución.

1. El presente contrato entrará en vigor a partir de su firma, estando el becario obligado a presentar a AEPNYA el trabajo íntegro no más tarde del mes de junio de 2015, y a presentarlo públicamente en el Congreso de AEPNYA de 2015 en la fecha y lugar que ésta designe.

2. El becario entregará a AEPNYA un ejemplar y un archivo en pdf del trabajo redactado en lengua española para poder distribuirlo entre los evaluadores.

### TERCERA.- Contribución de AEPNYA.

1. AEPNYA financiará el trabajo mediante una beca de DIEZ MIL EUROS (10.000.-€).

2. Dicha cantidad se hará efectiva a través de dos pagos a realizar mediante ingreso o transferencia en la cuenta corriente número [redacted] abierta en la entidad [redacted] designada por el becario, realizándose un primer pago de CINCO MIL EUROS (5.000.-€) dentro de los 30 días posteriores a la firma del presente contrato y otro pago de CINCO MIL EUROS (5.000.-€) condicionado a la previa presentación por el becario, en el Congreso AEPNYA 2014, de una memoria preliminar – explicativa de los avances del trabajo de investigación y, en su caso, de cualquier desviación respecto al programa de trabajo y los resultados previstos – y a su aprobación por AEPNYA.



3. AEPNYA se reserva el derecho de no efectuar el segundo pago en caso de que no se entregue en el plazo previsto la memoria preliminar del trabajo de investigación.

**CUARTA.- Gastos de asistencia a los Congresos de AEPNYA.**

Los gastos de desplazamiento, alojamiento y manutención relacionados con la asistencia a los Congresos de AEPNYA de los años 2014 y 2015 serán sufragados por el propio becario. La inscripción en el Congreso de 2014 y 2015 será sufragada por la AEPNYA.

**QUINTA.- Publicidad de la contribución financiera de AEPNYA.**

Las publicaciones y presentaciones públicas que se deriven de la realización del trabajo de investigación citarán expresamente la "Beca AEPNYA de investigación" en los agradecimientos y en las fuentes de financiación. También se hará constar que la comunicación, publicación o información sólo compromete a su autor, no representando la opinión de AEPNYA.

Asimismo, se precisará en el método que se ha obtenido la aprobación del Comité Ético del centro correspondiente y el consentimiento informado de los sujetos incluidos.

**SEXTA.- Responsabilidad.**

AEPNYA no será responsable de ninguna acción u omisión del becario que cause daño o perjuicio a un tercero durante la ejecución del presente contrato.

**SÉPTIMA.- Causas de resolución.**

1. El presente contrato podrá resolverse por mutuo acuerdo de las partes o por razones de fuerza mayor que afecten a la investigación desarrollada.





2. Asimismo, cualquiera de las partes podrá resolver el presente contrato en caso de incumplimiento de las obligaciones que en virtud del presente contrato incumben a la otra parte.

3. En caso de resolución del contrato por incumplimiento culpable del becario, AEPNYA podrá exigirle a éste el reembolso – con aplicación del interés legal del dinero – de una parte o de la totalidad de la contribución financiera percibida hasta la fecha de resolución, teniendo en cuenta el grado de avance del trabajo de investigación.

Y, en prueba de conformidad, suscriben el presente documento extendido en cuatro hojas de papel mecanografiadas por una de sus caras por duplicado ejemplar en el lugar y fecha referidos en el encabezamiento.



Fdo.: Josefina Castro Fornieles  
Presidenta de AEPNYA



Fdo.: Pablo José González Domenech

### ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Consentimiento informado para la propuesta de iniciar tratamiento-seguimiento libre de gluten y caseína/dieta normal en pacientes afectos de TEA, dirigido a las figuras parentales

D.....

con DNI.....

D<sup>a</sup>.....

con DNI.....

Padres/tutores del niño/a.....de.....y.....años de edad, con domicilio en.....Provincia de.....

CP.....

Tfnos.....; Email.....

#### CONFIRMAMOS

El Dr/a.....

D/a.....

Se ha identificado a nosotros como investigador del estudio de nuestro hijo/a que está teniendo lugar en la Unidad de Salud Mental Infanto-Juvenil del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

#### HEMOS RECIBIDO LA SIGUIENTE INFORMACIÓN

##### 1. Objetivos del tratamiento:

- Evaluar si existe una mejoría de los síntomas y comportamiento de los sujetos participantes al introducir durante un periodo de ...(3/6)... meses una dieta libre de alimentos que contienen gluten y caseína, existentes fundamentalmente en la leche y derivados, el trigo, la cebada, el centeno y la avena (se ha transmitido más información sobre alimentos libres de gluten y caseína).
- Esos cambios del comportamiento serán comparados con los que existen tras someter a esos mismos sujetos participantes, a una dieta normal, es decir, con gluten y caseína. El orden en el que los sujetos empezarán por un

tipo u otro de dieta (libre de gluten y caseína o normal) se determinará al azar. La duración total del estudio será de ...(6/12)... meses.

2. Los requisitos para participar son :
  - Estar diagnosticado según el manual de clasificación de los Trastornos mentales CIE-10 de alguna de las subcategorías de Trastorno del Espectro Autista.
  - Tener entre 2 y 18 años.
3. La duración prevista del tratamiento es de ...(6/12)... meses.
4. Se realizarán tres evaluaciones a lo largo de todo el estudio, a saber:
  - Al inicio del estudio, antes de comenzar cualquier intervención.
  - Tras la primera intervención dietética (dieta sin gluten y caseína o dieta normal, según asignación).
  - Tras la segunda intervención dietética (dieta sin gluten y caseína o dieta normal, según asignación).
5. Las pruebas que realizaremos en cada evaluación serán:
  - Cuestionarios de evaluación de síntomas y de conducta de los participantes y cuestionarios sobre el grado de seguimiento de las dietas, utilizando herramientas de evaluación validadas para tales fines.
  - Muestra de orina para obtener datos indirectos sobre la metabolización de la caseína. Análisis de sangre para determinar perfiles nutricionales y autoinmunes que puedan aportarnos más información al compararlos con los perfiles clínicos y conductuales de cada participante.
6. Las posibles molestias, efectos secundarios o complicaciones que podemos observar son:
  - Cambio de comportamiento de nuestro hijo.
  - Disminución de peso o apetito.
7. También se nos ha informado de las diferentes posibilidades terapéuticas existentes:
  - Medidas de psicoterapia y psicoeducación.
  - Fármacos para tratar los cambios de comportamiento o alteraciones mentales que pueden surgir en el autismo.
  - La probabilidad de beneficio para nuestro hijo/a es del 60 % frente al 10% con una dieta normal.

8. Se nos ha comunicado que en caso de urgencia, los teléfonos de contacto son 958 020 053; 650 653 501. Se pondrán en contacto con nosotros en el caso de que surjan alguna de estas circunstancias:
- Beben menos de 240 ml en un día
  - Orinan menos de 3 veces en un día
  - Rechazan mas de tres comidas en un intento
  - Tienen más de cuatro episodios diarreicos en un día
  - Tienen menos de una evacuación intestinal en una semana
  - Aparecen cansados, letárgicos o presentan cambios conductuales significativos
9. Se nos ha dejado un tiempo de 7 días para evaluar la decisión.
10. Se nos han aclarado las dudas y preguntas que hemos solicitado.
11. Nuestra decisión ha sido tomada de forma libre, sin presiones de ningún tipo por parte del equipo terapéutico/ investigador.
12. En caso de nuestra negativa, el equipo se compromete a respetar nuestra decisión, sin que dicha negativa influya en el tipo de ayuda que podamos solicitar para nuestro hijo/a.
13. Si lo solicitamos, se nos aportará la información necesaria sobre el tratamiento cuando concluya.
14. Se nos ha asegurado la confidencialidad de los datos, que sólo serán usados en nuestro beneficio y que se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

**TRAS ESTA INFORMACIÓN HEMOS DECIDIDO DAR LA CONFORMIDAD PARA INICIAR EL CITADO TRATAMIENTO DE NUESTRO HIJO/A, EN LOS TÉRMINOS EN QUE HA SIDO EXPRESADO ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

En.....a.....de.....201

Fdo. El padre del niño/a

Fdo. Madre del niño/a

Fdo. El responsable del estudio/tratamiento

(tachen lo que no proceda)



## **ANEXO 4. GUÍA DE IMPLEMENTACIÓN DE LA DLGC**

### **ESTUDIO DIETAS Y AUTISMO.**

#### **GUÍA PARA LA INTRODUCCIÓN DE UNA ALIMENTACIÓN SIN GLUTEN Y SIN CASEÍNA**

Esta guía pretende servir como asesoramiento para la implementación de una alimentación libre de gluten y caseína. Contiene algunos consejos sobre cómo poner en marcha esta dieta; Aporta información acerca de los alimentos que contienen gluten y caseína y los que están libres de estos componentes; Contiene un menú semanal libre de gluten y caseína para que sirva como referencia en la introducción de la dieta; Por último, ofrece una relación de teléfonos, centros, tiendas especializadas y páginas webs de interés en el tema.

Esperamos que esta información les sea de utilidad.

Atentamente,

El equipo investigador.

## 1. ANTES DE EMPEZAR:

- Prepare todo lo necesario.
- Fíjese en la dieta actual de su hijo y haga una lista de sus comidas favoritas. Hágalo aunque su hijo consuma una variedad muy limitada de alimentos. Una vez que tenga la lista, elimine las comidas que contienen gluten y caseína.
- Informe a maestros, abuelos, amigos y a todas las personas que pudieran encargarse de su alimentación.
- Pegue una lista de alimentos permitidos y prohibidos en la nevera.
- Planee sus salidas, paseos y visitas con todo lo necesario.
- Aunque adquirir estos conocimientos y chequear ingredientes le parezca una tarea abrumadora al principio, después aprenderá rápidamente qué ingredientes y alimentos son seguros y cuáles no. Este proceso pronto se hará automáticamente.
- Recuerde que esta dieta sólo funciona bien cuando se cumple al 100%.

### Indicaciones sobre la Implementación:

- Eliminación inmediata de productos que contengan caseína (leche y derivados lácteos).
- Eliminación progresiva (en un plazo de 7 a 10 días), de productos que contengan gluten o derivados.

## 2. ALIMENTOS PERMITIDOS:

- **Carnes y vísceras.** Frescas, congeladas y en conservas al natural. Sin rebozar. Evitar los embutidos.
- **Pescados y mariscos.** Frescos, congelados y en conservas al natural. Sin rebozar.
- **Huevos y mahonesa casera de huevo.**
- **Cereales sin gluten:** arroz, maíz, tapioca, mijo, lino, etcétera.
- **Legumbres:** Lentejas, garbanzos, alubias, guisantes, etcétera.

- **Tubérculos:** Patatas, boniatos, yucas, etcétera. Las patatas se pueden elaborar en todas sus modalidades (fritas, asadas), pero no pueden emborrizarse o enharinarse con panes o harinas que contengan gluten.
- **Frutas y verduras.** Todas están permitidas, pero sin procesar ni condimentar. Las frutas y verduras enlatadas pueden contener aditivos, especias y condimentos que podrían contener agregados de gluten y caseína; leer las etiquetas de los productos te ayudará a determinar su contenido.
- **Frutos secos:** Almendras, nueces, “kikos”, pasas, etc.
- **Vainilla, canela.**
- **Sal común, Azúcar y miel.**
- **Mantequilla de coco.**
- **Chocolate negro puro (sin leche)**
- **Infusiones y Café en grano.** Evitar el café instantáneo y el cacao en polvo.
- **Aceite** de Oliva o de girasol.
- **Vinagre** de vino.
- **Especias** en rama, en grano y todas las naturales.

### 3. ALIMENTOS PROHIBIDOS:

- **Cereales con gluten: Trigo, Centeno, Cebada, Avena, Triticale** (cereal sintético mezcla de trigo y centeno). También habrá que eliminar los productos derivados de estos cereales: almidón, harina, panes, galletas, empanados y emborrizados, pastas, etc.
- **Leche de vaca, cabra u oveja y sus derivados lácteos:** Yogur, queso, flanes, natillas, cuajada, mantequilla, nata, mahonesas, crema de leche, arroz con leche, algunos caramelos, etc. Deberá utilizarse otro tipo de leche como la leche de almendras o de soja y quesos como el tofu (elaborado a partir de la soja). Cuidado con los productos que tienen la etiqueta “*sin lactosa*”. La lactosa es el “azúcar” de la leche, lo que nosotros queremos suprimir es la caseína, que es su proteína.
- **Conservas** de carne y charcutería.
- **Chocolates con leche.**
- **Consomé en polvo** (tiene glutamato monosódico).

## **MEDICAMENTOS CON GLUTEN:**

LEA SIEMPRE EL PROSPECTO ANTES DE ADQUIRIR UN MEDICAMENTO. En caso de duda sobre el contenido en gluten como excipiente de algún medicamento, consúltelo a su farmacéutico.

**ES IMPORTANTE LEER LAS ETIQUETAS, REVISAR LA COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS PREPARADOS, ENLATADOS Y TENER ESPECIAL CUIDADO CON LOS ENDULZANTES, ESPESANTES (que pueden contener algunas de las harinas con gluten).**

**Aditivos permitidos:** Adenosine 5, Ácido Adípico, sal de amonio, ácido ascórbico, palmitato, Beta caroteno, ascorbato de calcio, carbonatos, celulosa, ácido fumárico, EDTA, gelatina, glicéridos, lecitina, pectina, psyllium, xantam gum, acacia gum.

**Aditivos prohibidos:** BHA, BHT, nitratos, nitritos, cafeína, aspartame, polisorbato 60, 80, sacarina, quinina, vanillin, TBC, colorantes y sabores artificiales.

**¡OJO!** Las **proteínas de la leche de vaca (caseínas)** pueden aparecer bajo diversas denominaciones: leche como tal, caseinato de sodio, caseinato de calcio, caseinato potásico, caseinato magnésico, hidrolizado proteico, caseina, suero láctico, H4511, H4512, lactábumina, lactoglobulina, ácido láctico, lactosa de origen animal.

**¡OJO!** La aparición de los siguientes ingredientes en la etiqueta de algún alimento, puede indicarnos la posible presencia del **gluten**, y por tanto hay que desechar su consumo. Son: Harinas, féculas, malta, sémola, almidón, aditivo cereal, cereal, emulsionante, esencia estabilizante, estabilizador, proteína vegetal hidrolizada, saborizante, fibra vegetal, jarabe de arroz tostado, monoglicéridos, diglicéridos.

## **4. EJEMPLOS DE ALIMENTOS PERMITIDOS:**

### **BEBIDAS PERMITIDAS:**

- Zumos naturales.
- Coca-cola, Pepsi-cola, Seven up, otros refrescos.
- Gatorade.

- Sunny Deligth.
- Sirope de chocolate.
- Infusiones y café en grano.

#### **“CHUCHES” Y APERITIVOS PERMITIDOS:**

- Chocولاتinas After –Eight (Nestlé)
- Chocolate negro puro.
- Chupa-Chups (no de fresa)
- Palomitas de maíz (que no tengan sabores o mantequilla añadidos).
- Productos Matutano en las siguientes versiones: Lay’s al punto de sal y Lay’s ligeras al punto de sal, Santa Ana, Ruffles onduladas.

#### **PRODUCTOS INFANTILES Y DIETÉTICOS:**

- Providextra Fresenius. Sustituto dietético elaborado con nutrientes exentos de Gluten y de Caseína. Cubre todas necesidades y aportes nutricionales.
- Leches infantiles: ALSOY
- Papillas: Cereales sin gluten; Crema de arroz.
- Tarritos 130g.: Compota de manzana; Frutas variadas; Plátano y manzana; Pera plátano “duo”.
- Tarritos 200g.: Jardinera de pollo y ternera; Menestra de cordero; Pollo y ternera con verduras; Ternera a la Jardinera; Ternera con arroz; Vaca y Jamón a la jardinera; Pollo con verduras y legumbres (primer menú); Ternera con verdura y legumbres (primer menú); Guisantes y ternera “duo”; Judías verdes y rape “duo”; Zanahorias y pollo “duo”; Macedonia de frutas y cereales; Manzana, melocotón y cereales; Plátano y manzana; Plátano, naranja y galleta; Postre de 6 frutas.
- Tarritos 300g.: Pollo con arroz y verduras (Gran menú); Estofado de carne con verduras (Gran menú).

### **CULINARIOS:**

- Fabada Asturiana Especial La Tila.
- Chile con carne Maggi
- Frijoles de la Hacienda Maggi.
- Tortilla de patata (Normal/con cebolla/con chorizo) Maggi.
- Puré de patatas (normal/con champiñones/jardinera) Maggi.
- Tomate frito Solis.
- Tomate Heinz Ketchup.
- Tomate tamizado Solis.
- Sofrito Solis.
- Salsa Boloñesa / Napolitana /con jamón Solis.
- Arroz a banda Maggi.
- Paella Maggi.
- Helados: Camigol, Gira hop, Happy-5, Kimi (fresa, limón, naranja), Mua-Mua, Tiñelenguas, Tropic. Todos de CAMY.

### **CHOCOLATES:**

- NESTLÉ Extra fino Negro, Negro Ecuador, Noir, Relleno Truffón, Relleno Moka, Dolca sin leche, Turrón Crocant.

### **CACAOS:**

- Cacao AMA azucarado.

### **PRODUCTOS DE LA CASA SANTIVERI PERMITIDOS:**

- Pan de maíz sin gluten Santiveri- Noglut
- Pasta sin gluten Santiveri- La Veneziane
- Arroz integral Vigor Santiveri
- Arroz integral de cultivo biológico Santiveri- Naturalia
- Fécula de patata Vigor

- Harina de arroz Vigor
- Harina de maíz Vigor
- Polenta Vigor Soja verde Natura
- Tapioca
- Papilla sin gluten Vigor Baby
- Tortitas de arroz
- Tortitas de arroz de cultivo biológico
- Soya Cuisine Provamel
- Batido de soja calcimel Provamel
- Batido de soja sin sal y sin azúcar Provamel
- Batido de soja sabor chocolate Provamel
- Bebida arroz de cultivo biológico O´riz
- Mostmanzana
- Mostuva blanco
- Mermeladas con fructosa Natura
- Dulce de membrillo
- Turrón blando de almendras Natura
- Turrón duro de almendras Natura
- Turrón de yema Natura
- Turrón de coco
- Turrón de mazapán/ con frutas
- Turrón de chocolate Fondant con almendras
- Soya- Yofu mesa Provamel
- Soya- Yofu macedonia Provamel
- Dulzol
- Batidos de soja sabor vainilla Provamel
- Soya crem Vainilla Provamel
- Soya crem Chocolate Provamel.

## EJEMPLOS DE SUSTITUTIVOS DE LA LECHE:

- Leche de soja.
- Leche de almendras (la condensada parece que está buena y cunde bastante aunque no vale para platos salados o bechamel)
- Leche fortificada de arroz, de soya o de patata.
- Margarinas especiales (en tiendas especializadas).
- Leche Sol-2 de Milupa.
- Bebida láctea dietética Harifen (Casa comercial Sanaví). Bebida láctea elaborada con leche de vaca, pero sin la proteína caseína.

## ALGUNOS ALIMENTOS RICOS EN CALCIO:

- Espinacas, brócoli, almendras, nueces de Brasil, pistachos, semillas de girasol (pipas), zanahorias, repollo, ajo, coliflor, higos.

## 5. EJEMPLO DE DIETA SEMANAL:

### LUNES

---

Desayuno:	Zumo de uva fresco/naranja/manzana. Tostadas sin gluten y mermelada, o galletas sin gluten, o kellogs de maíz tostado con leche de soja o almendras.
A media mañana:	Una unidad de fruta, o galletas sin gluten.
Almuerzo:	Arroz con alcachofas, o arroz con tomate y huevo escalfado. Trucha al horno, con patatas asadas. Un plátano.
Merienda:	Bocadillo: Pan sin gluten (jamón york o pavo trufado o jamón serrano,...), o una pieza de fruta, o bien galletas con leche de almendras o soja con cacao en polvo.
Cena:	Judías verdes con patatas hervidas, o bien sopa o consomé. Pechuga de pollo a la plancha. Manzana.



## MARTES:

---

Desayuno: Zumo de naranja o leche de almendras y cacao. Galletas o tostadas sin gluten, con mermelada, o Kellog's de maíz tostado.

A media mañana: Una pieza de fruta del tiempo, o zumo natural.

Almuerzo: Lentejas. Cordero asado. Una pera.

Merienda: Una unidad de fruta, o bocadillo (pan sin gluten) de foie gras.

Cena: Guisantes y maíz hervidos. Hamburguesa (sin queso), con patatas fritas. Una unidad de fruta, o leche de almendras/soja, con galletas.

## MIERCOLES:

---

Desayuno: Zumo de zanahoria/manzana/naranja fresco, más un kiwi. Tostadas sin gluten con mermelada. Leche de almendras/soja con cacao.

A media mañana: Una pieza de fruta del tiempo.

Almuerzo: Menestra de verduras o espaguetis (sin gluten) con tomate. Merluza/Gallo/pez espada (aceite, perejil,...) a su gusto, o tortilla de patatas. Un plátano.

Merienda: Galletas o tostadas sin gluten. Jamón serrano.

Cena: Caldo o consomé. Pollo o pavo con tomate. Un melocotón.

## JUEVES:

---

Desayuno: Zumo de uva fresco, o zumo de naranja. Galletas o tostadas sin gluten con mermelada, o kellogs de maíz.

A media mañana: Un zumo natural o fruta.

Almuerzo: Pasta sin gluten con tomate fresco y albahaca. Escalopines con tomate. Fruta del tiempo.

- Merienda: Zumo natural. Bocadillo a su gusto (pan sin gluten).
- Cena: Sopa juliana, o ensalada de lechuga, tomate, maíz y atún. Rape a la plancha, o filete de ternera con patatas fritas. Leche de almendras/soja con galletas sin gluten.

#### VIERNES:

---

- Desayuno: Zumo de fruta natural, o leche de almendras/soja con cacao. Tostadas o galletas sin gluten con mermelada.
- A media mañana: Una pieza de fruta del tiempo.
- Almuerzo: Menestra de verduras. Paella. Una pieza de fruta.
- Merienda: Galletas sin gluten. Jamón serrano.
- Cena: Calamares a la plancha o a la romana. Tortilla francesa de un huevo. Una pieza de fruta.

#### SÁBADO:

---

- Desayuno: Zumo de manzana fresco. Galletas sin gluten.
- A media mañana: Una pieza de fruta o zumo natural.
- Almuerzo: Espárragos trigueros a la plancha, o puré de verduras. Salmonete/gallo/besugo al horno. Una pieza de fruta.
- Merienda: Jamón york y dos tostadas de pan sin gluten.
- Cena: Ensalada de tomate. Pollo asado con patatas. Una pieza de fruta.

#### DOMINGO:

---

- Desayuno: Zumo de fruta. Una pera o bien leche de almendras/soja con cacao y galletas sin gluten, o kellogs de maíz tostado.
- A media mañana: Una pieza de fruta del tiempo, o zumo natural o un vaso de leche de almendras/soja.

Almuerzo:	Lentejas con arroz. Lubina a la parrilla, o emperador/merluza a la plancha. Un plátano.
Merienda:	Jamón serrano o pavo. Dos tostadas sin gluten.
Cena:	Ensalada de lechuga. Menestra de verduras salteada con champiñón y jamón serrano. Una pieza de fruta del tiempo.

**NOTA:**

Los zumos y frutas que se indican en el desayuno, puede realizarlos en licuadora si lo desea.

Las galletas y el pan deben ser sin gluten. Para ello hay marcas especializadas en el mercado (ver Ejemplos de alimentos permitidos).

Usted puede intercambiar los platos de unos días con otros, según sus preferencias gastronómicas, incluso introducir nuevos platos siguiendo las precauciones pertinentes.

## 6. INFORMACIÓN ADICIONAL:

### A) PÁGINAS WEBS ÚTILES:

- LINCA: [www.linca.org](http://www.linca.org)  
“LINCA” son las siglas de: “*Liga de Intervención Nutricional Contra Autismo e hiperactividad*”. Es una asociación sin ánimo de lucro formada por profesionales y padres de niños autistas. Trata de orientar acerca de los tratamientos biológicos y nutricionales que se utilizan en el autismo, asesoran en la implementación de una dieta sin gluten y caseína (suministrando listado de alimentos permitidos y prohibidos, menús, recetas, etc) y crean un espacio de enlace entre profesionales y padres.
- AUTISM NETWORK FOR DIETARY INTERVENTION: [www.autismndi.com](http://www.autismndi.com)  
Página web que contiene información para familiares que tienen algún miembro autista siguiendo una intervención dietética. La página está escrita en inglés, pero tiene una sección en español.
- VIAJAR SIN GLUTEN.COM: [www.viajarsingluten.com](http://www.viajarsingluten.com)  
Web que contiene una relación de bares, restaurantes, tiendas y hoteles que ofrecen productos elaborados sin gluten.

- ALIMENTOS PARA TODOS SIN GLUTEN Y CASEINA:  
Página de facebook orientada a alimentos de repostería sin gluten y sin caseína, para aportar ideas en la elaboración casera de productos para desayunos, postres y meriendas.
- COCINA INTELIGENTE/ALIMENTOS SIN GLUTEN Y CASEÍNA:  
Página de facebook que recoge información sobre recetas y alimentos naturales, libres de conservantes, aditivos y orientada también a la exclusión del gluten y la caseína.
- RECETAS MAGICAS PARA EL AUTISMO:  
[www.recetasmagicasparaelaautismo.blogspot.com.es](http://www.recetasmagicasparaelaautismo.blogspot.com.es)  
Blog creado por una madre de dos niños autistas donde se apuntan ideas para cocinar sin gluten y sin caseína.

## **B) hipermercados donde se pueden encontrar PRODUCTOS LIBRES DE GLUTEN Y CASEÍNA**

- Mercadona
- Eroski
- Día
- Lidl
- Carrefour
- El Corte Inglés

## **C) OTROS PUNTOS DE INFORMACIÓN**

- Asociación de Celíacos de Andalucía.
- Apdo. de Correos: 598. 14080 Córdoba. Tfno: 630 245440; E-mail: [celiacos@tpi.infomail.es](mailto:celiacos@tpi.infomail.es)
- Federación de Asociaciones de Celíacos de España (FACE). Tfno: 917254533/ 944168217.
- Autism Network for Dietary Information. [www.autismndi.com](http://www.autismndi.com) (sección en castellano).
- Empresas dietéticas: Sanavi. Línea Harisín. Tfno: 958.457127; Santiveri S.A. Lineas Le Veneciane, Noglut, Natura, Naturalia, Santiveri, Viger. Tfno. Delegación comercial: 981209779 (Distribuidos en herboristerías, tiendas especializadas y grandes almacenes).

## ANEXO 5. ESCALA DE EVALUACIÓN DE TRATAMIENTO EN EL AUTISMO (ESCALA ATEC)

Nombre del niño/a:

Sexo:

Edad:

Fecha de nacimiento:

Fecha de aplicación de la prueba:

Nombre del terapeuta:

Centro de trabajo:

Marque con un círculo la letra que considere cierta en cada frase

I. Habla/Lenguaje/Comunicación: [N] No es cierto; [A] A veces es cierto;  
[M] Muy cierto

---

N A M 1. Conoce su nombre

N A M 2. Responde a “no” o “basta”

N A M 3. Es capaz de obedecer órdenes

N A M 4. Puede usar una palabra (¡no!, comer, agua, etc.)

N A M 5. Puede usar dos palabras a la vez (No quiero)

N A M 6. Puede usar tres palabras a la vez ( Quiero más leche)

N A M 7. Conoce diez o más palabras

N A M 8. Puede utilizar frases con cuatro o más palabras

N A M 9. Explica lo que él /ella quiere

N A M 10. Hace preguntas con sentido

N A M 11. El discurso tiene sentido o es relevante

N A M 12. Usa frases variadas sucesivamente

N A M 13. Lleva una conversación adecuada

N A M 14. Tiene una habilidad normal para comunicarse con los niños/as de su edad.

PUNTUACIÓN I:

II. Sociabilidad: [N] No descriptivo; [A] Algo descriptivo; [M] Muy descriptivo

---

N A M 1. Parece estar dentro de una coraza. Es inaccesible

N A M 2. Ignora a los demás

N A M 3. Presta poca/ninguna atención cuando alguien se dirige a él/ella

N A M 4. No coopera y se resiste

N A M 5. No mantiene contacto ocular

N A M 6. Prefiere estar solo

N A M 7. No muestra afecto

N A M 8. No saluda a los padres

N A M 9. Evita el contacto con los demás

N A M 10. No imita

N A M 11. Desagrado cuando se le caricia o abraza

N A M 12. No comparte o muestra algo interesante

N A M 13. No se despide con la mano

N A M 14. Está en desacuerdo, no es sumiso

N A M 15. Rabietas, berrinches

N A M 16. No tiene amigos/compañeros

N A M 17. Sonríe poco...Sonrisas

N A M 18. Insensible a los sentimientos de los demás

PUNTUACIÓN II:

III. Conciencia sensorial-cognitiva: [N] No descriptivo; [A] Algo descriptivo; [M] Muy descriptivo

---

- N A M 1. Responde a su nombre
- N A M 2. Responde a cumplidos
- N A M 3. Mira a personas y a animales
- N A M 4. Mira dibujos (y televisión)
- N A M 5. Dibuja, pinta, construye
- N A M 6. Juega con juguetes de forma apropiada
- N A M 7. Expresión de la cara apropiada
- N A M 8. Entiende las historias de la TV
- N A M 9. Entiende las explicaciones
- N A M 10. Tiene conciencia del entorno
- N A M 11. Tiene conciencia de peligro
- N A M 12. Es imaginativo
- N A M 13. Inicia actividades
- N A M 14. Se viste solo/a
- N A M 15. Es curioso, interesado
- N A M 16. Le gusta explorar
- N A M 17. Sintoniza con lo que sucede a su alrededor, no está en las nubes
- N A M 18. Mira hacia donde otros están mirando

PUNTUACIÓN III:

IV. Salud física/comportamiento [N] No es un problema [MI] Problema mínimo  
[PM] Problema moderado [PG] Problema grave

---

- N MI PM PG 1. Se orina en la cama (noche)
- N MI PM PG 2. Moja los pañales (día)
- N MI PM PG 3. Ensucia los pañales/pantalones
- N MI PM PG 4. Diarrea
- N MI PM PG 5. Estreñimiento
- N MI PM PG 6. Problemas de sueño
- N MI PM PG 7. Come en exceso o poco
- N MI PM PG 8. Dieta muy limitada
- N MI PM PG 9. Hiperactividad
- N MI PM PG 10. Letargia/Somnolencia
- N MI PM PG 11. Se autolesiona o golpea
- N MI PM PG 12. Golpea o lesiona a otros
- N MI PM PG 13. Comportamiento destructivo
- N MI PM PG 14. Sensibilidad al sonido
- N MI PM PG 15. Ansioso/a, temeroso/a
- N MI PM PG 16. Está triste, llora
- N MI PM PG 17. Convulsiones
- N MI PM PG 18. Discurso obsesivo
- N MI PM PG 19. Rutinas rígidas
- N MI PM PG 20. Grita o da voces
- N MI PM PG 21. Siempre pide lo mismo
- N MI PM PG 22. Se agita con frecuencia
- N MI PM PG 23. No sensible al dolor
- N MI PM PG 24. Enganchado o fijado a ciertos objetos o temas
- N MI PM PG 25. Movimientos repetitivos (balanceo, etc.)

PUNTUACIÓN IV:

Puntuación:

I:            II:            III:            IV:            Total:



## ANEXO 6. EVALUACIÓN RESUMIDA DEL COMPORTAMIENTO (ESCALA ERC-III)

### CUESTIONARIO ERC- III

0 Nunca      1 A veces      2 A menudo      3 Casi siempre      4 Siempre

- I) REPLIEGUE AUTISTA      0      1      2      3      4
1. Busca el aislamiento.....
2. Ignora a los demás.....
3. Interacción social insuficiente.....
4. Mirada inadecuada .....

PUNTUACIÓN I:

### II) ALTERACIONES DE LA COMUNICACIÓN

VERBAL Y NO VERBAL      0      1      2      3      4

1. No se esfuerza en comunicarse a través de la voz y palabra .....
2. Dificultad en comunicarse a través de los gestos .....
3. Emisiones vocales o verbales estereotipadas .....

PUNTUACIÓN II:

### III) REACCIONES EXTRAÑAS AL ENTORNO      0      1      2      3      4

1. Falta de iniciativa.....
2. Problemas de conducta en la utilización de objetos .....
3. Intolerancia al cambio.....

PUNTUACIÓN III:

IV) ALTERACIONES DE LA MOTILIDAD            0    1    2    3    4

1. Actividad sensorio-motriz estereotipada .....

2. Agitación-turbulencia .....

3. Mímica, posturas, marcha extraña .....

PUNTUACIÓN IV:

V) REACCIONES AFECTIVAS INADECUADAS    0    1    2    3    4

1. Autoagresividad .....

2. Heteroagresividad .....

3. Signos pequeños de ansiedad .....

4. Alteraciones del humor .....

PUNTUACIÓN V:

VI) ALTERACIÓN DE LAS GRANDES  
FUNCIONES INSTINTIVAS                            0    1    2    3    4

1. Alteración de la conducta alimentaria .....

PUNTUACIÓN VI:

VII) ALTERACIÓN DE LA ATENCIÓN, DE LA PERCEPCIÓN Y DE  
LAS FUNCIONES INTELECTUALES                0    1    2    3    4

1. Dificultad en la fijación de la atención .....

2. Oye cosas extrañas .....

PUNTUACIÓN VII

PUNTUACIÓN TOTAL:

## ANEXO 7. ESCALA DE CONDUCTA ABERRANTE (ESCALA ABC)

Fecha: ..... Paciente ..... Puntuación .....

No piense excesivamente sobre cada ítem, ya que la primera impresión suele ser la buena. Puntúe cada respuesta según los siguientes criterios:

0: No presenta este problema en absoluto

1: Problema leve

2: Problema de gravedad moderada

3: Problema importante

1. Excesiva actividad en el centro	0	1	2	3
2. Auto-agresividad	0	1	2	3
3. Apatía, pereza, inactividad	0	1	2	3
4. Agresividad hacia otros pacientes o el personal	0	1	2	3
5. Búsqueda de aislamiento del resto de sujetos	0	1	2	3
6. Movimientos recurrentes sin sentido	0	1	2	3
7. Ser demasiado “escandaloso” o “ruidoso”	0	1	2	3
8. Gritar “sin venir a cuento”	0	1	2	3
9. Hablar excesivamente	0	1	2	3
10. Rabietas	0	1	2	3
11. Movimientos estereotipados o repetidos	0	1	2	3
12. Ensimismamiento, mirada perdida	0	1	2	3
13. Impulsividad (realiza actos sin pensar)	0	1	2	3
14. Irritabilidad	0	1	2	3
15. Inquietud, incapacidad de estar quieto	0	1	2	3
16. Inhibición; prefiere actividades solitarias	0	1	2	3
17. Conductas extrañas o estrambóticas	0	1	2	3
18. Desobediencia; dificultad para controlarlo	0	1	2	3
19. Gritos inoportunos	0	1	2	3
20. Expresión facial rígida	0	1	2	3
21. Molesta a los otros	0	1	2	3
22. Lenguaje repetitivo	0	1	2	3
23. No hace nada; se sienta y mira a los otros	0	1	2	3

24. No coopera con los demás	0	1	2	3
25. Humor deprimido	0	1	2	3
26. Se resiste a cualquier forma de contacto físico	0	1	2	3
27. Vuelve la cabeza hacia atrás continuamente	0	1	2	3
28. No presta atención a las instrucciones	0	1	2	3
29. Sus demandas deben ser satisfechas inmediatamente	0	1	2	3
30. Se aísla a sí mismo/a del resto	0	1	2	3
31. Desbarata las actividades de grupo	0	1	2	3
32. Se sienta o permanece en una misma posición mucho tiempo	0	1	2	3
33. Habla consigo mismo en voz alta	0	1	2	3
34. Lloro ante mínimos disgustos o pequeños golpes	0	1	2	3
35. Realiza movimientos repetitivos de manos, cuerpo o cabeza	0	1	2	3
36. Cambia de humor repentinamente	0	1	2	3
37. No responde a las actividades del centro	0	1	2	3
38. No se queda quieto en su sitio durante las clases	0	1	2	3
39. Procura no quedarse solo, aún por poco tiempo	0	1	2	3
40. Es difícil acercarse o establecer relación con él	0	1	2	3
41. Lloro y chilla de forma inapropiada	0	1	2	3
42. Prefiere estar solo	0	1	2	3
43. No intenta comunicarse mediante palabras y gestos	0	1	2	3
44. Se distrae fácilmente	0	1	2	3
45. Mueve o agita las extremidades repetidamente	0	1	2	3
46. Repite una palabra o una frase una y otra vez	0	1	2	3
47. Da patadas, mientras tira objetos o da portazos	0	1	2	3
48. Corre o salta constantemente por la habitación	0	1	2	3
49. Mueve el cuerpo hacia delante y hacia atrás una y otra vez	0	1	2	3
50. Se hace heridas a sí mismo de forma deliberada	0	1	2	3
51. No presta atención cuando le hablan	0	1	2	3
52. Es violento consigo mismo	0	1	2	3
53. Es inactivo, nunca se mueve de forma espontánea	0	1	2	3
54. Tiende a ser excesivamente activo	0	1	2	3
55. Responde de forma negativa a las muestras de cariño	0	1	2	3
56. Ignora las órdenes de forma deliberada	0	1	2	3
57. Coge rabietas cuando no consigue lo que quiere	0	1	2	3
58. Presenta poca interacción social con los otros	0	1	2	3

## ANEXO 8. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE ALIMENTOS (CUESTIONARIO FFQ)

Para cada alimento, indicar el número que corresponda. La frecuencia de consumo va referida a los tres meses previos:

- 0: Nunca lo ha consumido
- 1: Lo ha consumido una o dos veces al mes
- 2: Lo ha consumido una vez a la semana
- 3: Lo ha consumido varias veces a la semana
- 4: o ha consumido todos los días

### I - PRODUCTOS LACTEOS

0    1    2    3    4

1. Leche de vaca, oveja o cabra (1 taza, 200 cc) .....
2. Leche de almendras (1 taza, 200 cc) .....
3. Leche de soja (1 taza, 200 cc) .....
4. Leche condensada (1 cucharada) .....
5. Batidos de leche (1 vaso, 200 cc) .....
6. Batidos de leche y fruta (1 vaso, 200 cc) .....
7. Yogurt (uno, 125 gr) .....
8. Yogurt con frutas (uno, 125 gr) .....
9. Kéfir .....
10. Petit-suisse y similares (uno, 100 gr) .....
11. Requesón o cuajada (1/2 taza) .....
12. Queso curado ó semi-curado (1, porción) .....
13. Queso blanco o fresco (Burgos, cabra...) (50 gr) .....
14. Natillas, flan, pudding, arroz con leche (1 taza, 200 cc) .....
15. Nata o crema de leche (1/2 taza) .....
16. Mantequilla .....
17. Helados (uno).....

## II - HUEVOS, CARNES, PESCADOS

(Un plato o ración contiene 100-150 gr., excepto si se indica otra cosa)

	0	1	2	3	4
1. Huevos de gallina (uno) .....					
2. Pollo o pavo con piel .....					
3. Pollo o pavo sin piel .....					
4. Carne de ternera o vaca magra .....					
5. Carne de ternera o vaca grasa .....					
6. Carne de cerdo magra .....					
7. Carne de cerdo grasa .....					
8. Carne de cordero .....					
9. Conejo o liebre .....					
10. Hígado .....					
11. Otras vísceras (sesos, corazón, mollejas) .....					
12. Jamón serrano o paletilla .....					
13. Jamón York, jamón cocido (50 gr) .....					
14. Embutidos (chorizo, salchichón, mortadela, 50 gr) .....					
15. Salchichas (50 gr) .....					
16. Patés, foie-gras (25 gr) .....					
17. Morcilla (50 gr) .....					
18. Hamburguesa (50 gr) .....					
19. Sobrasada (50 gr) .....					
20. Tocino, bacon, panceta (50 gr) .....					
21. Pescado blanco: pescadilla, merluza, besugo, mero, lenguado, etc. (1 plato, pieza o ración) .....					
22. Pescado azul: sardinas, atún, bonito, caballa, salmón, etc. (1 plato, pieza o ración) .....					
23. Salados/ahumados: bacalao, arenques, salmón, etc .....					
24. Ostras, almejas, mejillones, etc. (6 unid.) .....					
25. Gambas, langostinos, cigalas, etc .....					
26. Pulpo, calamares, chipirones, jibia .....					

### III - VERDURAS Y HORTALIZAS

(Un plato o ración contiene 250 gr., excepto si se indica otra cosa)

	0	1	2	3	4
1. Acelgas, espinacas .....					
2. Col, coliflores, brócoli .....					
3. Lechuga, endibias, escarola .....					
4. Tomate crudo (uno; 150 gr) .....					
5. Zanahoria, calabaza .....					
6. Judías verdes .....					
7. Berenjenas, calabacines, pepinos .....					
8. Pimientos .....					
9. Espárragos .....					
10. Gazpacho Andaluz .....					
11. Patatas fritas (caseras, bolsa , 1 ración, 150 gr) .....					
12. Patatas asadas o cocidas (1 ración, 150 gr) .....					

### IV - FRUTAS

(una pieza o ración, excepto si se indica otra cosa)

	0	1	2	3	4
1. Naranja, pomelo (una), ó mandarina (dos) .....					
2. Plátano .....					
3. Manzana, pera .....					
4. Fresas/fresones (6 unidades, plato postre) .....					
5. Melocotón, albaricoque, nectarina .....					
6. Cerezas, picotas, ciruelas (1 plato de postre) .....					
7. Higos, brevas .....					
8. Sandía (1 tajada, 200-250 gr.) .....					
9. Melón (1 tajada, 200-250 gr.) .....					
10. Uvas (un racimo, un plato postre) .....					
11. Frutas en almíbar (2 unidades) .....					
12. Frutas en su jugo (2 unidades) .....					
13. Dátiles, higos secos, pasas, ciruelas-pasas (150 gr.) .....					
14. Almendras, cacahuetes, avellanas, nueces (50 gr.) .....					
15. Aceitunas (10 unidades) .....					
16. Aguacates .....					

## V - LEGUMBRES Y CEREALES

(Un plato o ración de 60 gr en seco, excepto si se indica otra cosa)

	0	1	2	3	4
1. Lentejas .....					
2. Garbanzos .....					
3. Alubias (pintas, blancas o negras) .....					
4. Guisantes .....					
5. Pan blanco (3 rodajas, 60 gr) .....					
6. Pan negro integral (3 rodajas, 60 gr) .....					
7. Cereales desayuno (30 gr en seco) .....					
8. Arroz blanco (60 gr en seco) .....					
9. Pasta: fideos, macarrones, espaguetis, (60 gr en seco) .....					
10. Pizza (1 ración, 200 g) .....					

## VI - ACEITES Y GRASAS

(Una cucharada o porción individual)

	0	1	2	3	4
1. Margarina (porción individual) .....					
2. Aceite de oliva (una cucharada) .....					
3. Aceite de girasol .....					
4. Aceite de soja .....					
5. Aceite de maíz .....					
6. Manteca de cerdo .....					
7. Otros .....					

## VII - PRODUCTOS DE PASTELERÍA

	0	1	2	3	4
1. Galletas (4-6 unidades, 50 g) .....					
2. Magdalenas (1-2 unidades) comerciales .....					
3. Bollería industrial: ensaimada, croissant, magdalena, donut (uno, 50 gr) ....					
4. Bollería repostería casera .....					
5. Pasteles (uno, 50 gr) .....					
6. Churros, porras y similares (ración, 100 gr) .....					
7. Chocolates y bombones (30 gr) .....					
8. Turrón (1/8 de barra) .....					
9. Pastas de te, mantecados, mazapán (ración, 90 gr) .....					



## VIII - BEBIDAS

0 1 2 3 4

1. Vino (1 vaso 100 cc) .....
2. Cerveza (1 jarra, 330 cc) .....
3. Licores, destilados (1 copa, 50 cc) .....
4. Bebidas carbonatadas con azúcar  
(Coca-cola, Fanta, etc. 1 botella, 200cc) .....
5. Bebidas carbonatadas bajas en calorías  
(Casera, Coca-cola light, Tab, etc. 1 botella, 200 cc) .....
6. Zumo de naranja natural (1 vaso, 200 cc) .....
7. Zumos naturales de otras frutas (1 vaso, 200 cc) .....
8. Zumos de frutas en botella o enlatados (200 cc) .....
9. Batidos o Smoothies .....
10. Batidos de cereales .....
11. Limonada y otros granizados .....
12. Bebidas isotónicas y energéticas .....
13. Café (1 taza, 50 cc) .....
14. Infusiones (té, manzanilla, tila) .....

## IX - MISCELÁNEA

0 1 2 3 4

1. Croquetas, buñuelos, empanadillas .....
2. Sopas y cremas de sobre .....
3. Mostaza (1 cucharadita) .....
4. Mayonesa (1 cucharadita) .....
5. Salsa de tomate, tomate frito, ketchup .....
6. Picante: tabasco, pimienta .....
7. Sal (una pizca) .....
8. Azúcar (1 cucharadita) .....
9. Mermeladas (1 cucharadita) .....

## ANEXO 9. RECUERDO DE 24 HORAS

### INSTRUCCIONES PARA REALIZAR EL RECUERDO DE 24 HORAS:

- Por favor, antes de comenzar, lea las siguientes observaciones que le ayudarán a optimizar la recogida de los datos.
- El objeto de esta encuesta es conocer su consumo diario de alimentos y bebidas.
- Anote con la mayor precisión posible todos los alimentos y bebidas consumidos a lo largo de un día completo de 24 horas.
- Para este estudio, se cumplimentarán dos encuestas semanales, eligiendo de cada semana dos días al azar (incluyendo días laborables, fines de semana, festivos, “días de comidas especiales”, etc.).
- Puede empezar por el desayuno del día que haya elegido y continuar hasta completar el recuerdo de la dieta del día entero.
- Anote los alimentos consumidos entre horas.
- Escriba la calidad del alimento (leche entera o desnatada, pan blanco o integral, tipo de carne, aceite, etc.) y estime la cantidad consumida en medidas caseras o en raciones (grande, mediana, pequeña). La información que figura en el envase de muchos alimentos puede ser muy útil para este fin.
- No olvide anotar el aceite empleado en las preparaciones culinarias, el pan, el azúcar o las bebidas consumidas (refrescos y bebidas alcohólicas). Resulta muy útil registrar el método de preparación culinario (cocido, frito, asado, etc.) para estimar posteriormente la cantidad de aceite utilizado, si éste no se conoce con exactitud.
- Para facilitar el recuerdo, escriba inicialmente el menú consumido en cada comida y luego describa detalladamente los ingredientes.
- Igualmente, para ayudar a memorizar, es muy práctico recordar dónde comimos, con quién, a qué hora, quién preparó la comida.
- En caso de duda, puede consultar con el equipo de investigación en los teléfonos destinados para tal fin.

## Cuestionario de recuerdo de 24 horas

Trate de recordar todos los alimentos y bebidas que su hijo consumió ayer.

Fecha correspondiente al día de recuerdo:	Edad:
Nombre:	Sexo:
Actividad física (baja, moderada, elevada):	Peso (kg):
Consumo de suplementos (tipo y cantidad):	Talla (m):

DESAYUNO	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	

COMIDA	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	

MERIENDA	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	

CENA	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	

ENTRE HORAS	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	

La comida anterior, ¿ha sido diferente por algún motivo?    Sí     NO   
En caso afirmativo, indique por qué:

## ANEXO 10. ENCUESTA DE ANTECEDENTES DE TRASTORNOS GASTROINTESTINALES Y DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO

Informante (nombre y parentesco) .....

Nombre del niño..... Edad .....

### ANTECEDENTES DE TRASTORNOS GASTROINTESTINALES

1. Alergias:  No  Si
2. Dolor/cólico abdominal  No  Si
3. Vómitos  No  Si
4. Diarreas  No  Si
5. Estreñimiento  No  Si
6. Meteorismo (gases)  No  Si

### ANTECEDENTES DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO

1. Presentó dificultad para incorporar los alimentos sólidos  
 No  Si
2. Entre el año y los 15 meses su alimentación se basaba casi exclusivamente en leche y otros líquidos con ausencia o muy pocos sólidos  
 No  Si
3. A los 15 meses aún no utilizaba cuchara  
 No  Si
4. A los 15 meses aún no bebía directamente en el vaso (tenía que utilizar el biberón)  
 No  Si

5. Ha presentado dificultad para incorporar alimentos nuevos  
 No       Si
6. Ha presentado dificultades en la masticación  
 No       Si
7. Actualmente no mastica bien  
 No       Si
8. Sus gustos alimentarios se restringen a tres o cuatro comidas  
 No       Si
9. Con frecuencia regurgita los alimentos  
 No       Si
10. Come muy despacio; las comidas se hacen interminables  
 No       Si
11. No es capaz de absorber con pajita  
 No       Si
12. No toma alimentos sólidos, solo puré  
 No       Si
13. Presenta conductas de pica (ingesta de sustancias no alimentarias)  
 No       Si

## ANEXO 11. COMPROMISO DE RESPETO DE LOS DERECHOS DE AUTOR

El doctorando Pablo José González Domenech y los directores de la tesis Francisco Díaz Atienza y Luis Gutiérrez Rojas

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 6 de octubre de 2019

Directores de la Tesis:



Fdo.: Francisco Díaz Atienza



Fdo.: Luis Gutiérrez Rojas

Doctorando:



Fdo.: Pablo José González Domenech

**ANEXO 12. GONZÁLEZ-DOMENECH ET AL. /MENTAL HEALTH RESEARCH IN INTELLECTUAL DISABILITIES. PUBLICADO ON-LINE: 30 AGOSTO 2019 [HTTPS://DOI.ORG/10.1080/19315864.2019.1654574](https://doi.org/10.1080/19315864.2019.1654574)**

Influence of a gluten-free, casein-free diet on behavioral disturbances in children and adolescents diagnosed with autism spectrum disorder: a 3-month follow-up pilot study

**Pablo José González Domenech<sup>a,b</sup>, Francisco Díaz Atienza<sup>a</sup>, Carlos García Pablos<sup>a</sup>, Sandra Serrano Nieto<sup>a</sup>, Óscar Herreros Rodríguez<sup>a</sup>, Luis Gutiérrez-Rojas<sup>b,c</sup>, José María Martínez-Ortega<sup>b</sup>.**

<sup>a</sup>Child and Adolescent Mental Health Unit, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

<sup>b</sup>Department of Psychiatry and CTS-549 Research Group, Institute of Neurosciences, University of Granada, Granada, Spain

<sup>c</sup>Psychiatry Service, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain

**Corresponding author:**

Luis Gutiérrez-Rojas, M.D.

CTS-549 Research Group, Facultad de Medicina, torre A, planta 9 – E-18071 Granada, Spain.

Telephone 34 958 240704. Fax 34 958 246187.

E-mail: [gutierrezrojasl@hotmail.com](mailto:gutierrezrojasl@hotmail.com)

**Abstract**

**Introduction:** *Diet and dietary interventions have drawn considerable attention in the literature as etiopathogenic factors and therapeutic approaches to Autism Spectrum Disorders (ASD), respectively. The objective of the present study was to determine the influence of a gluten-free, casein-free (GFCF) diet on the alterations of behavior in children and adolescents diagnosed with ASD. We also aim to explore the possible association between ASD symptoms urinary concentrations of beta-casomorphin.*

**Method:** *A total of 28 patients were recruited for this crossover clinical trial. Patients followed a normal diet (including gluten and casein) for three months and a GFCF diet for another three months. The order of the intervention —i.e., beginning with normal diet or with GFCF diet— was determined at random. The subjects*

were evaluated at three time points: at the onset of the study, after the first diet, and after the second diet. Each evaluation entailed three questionnaires on behavior and autism, a food frequency questionnaire (to determine adherence to the diet) and a determination of the concentration of beta-casomorphin in urine using chromatographic techniques.

**Results:** No significant behavioral changes were found after a GFCF diet. No association was found between ASD symptoms and urinary concentrations of beta-casomorphin.

**Conclusions:** A GFCF diet followed for three months do neither show significant changes in behavioral symptoms of autism nor in urine concentrations of beta-casomorphin using chromatographic detection techniques. However, we need further studies that including elements of placebo and double-blindness and more sophisticated beta-casomorphin detection techniques to better define subjects who might benefit from these diets.

**Key-words:** Autism spectrum disorders; diet; gluten-free; casein-free; beta-casomorphin.

### **Highlights**

The main hypothesis of our study is that a gluten-free, casein-free (CFGF) diet can improve the behavior in autism spectrum disorder (ASD) patients and that these changes can be related to urine concentrations of beta-casomorphin. The results show that a 3-month intervention with GFCF diet did not change behavior in ASD patients nor did it show an association with the urinary concentrations of beta-casomorphin.

The inclusion elements of placebo and double-blind evaluation and techniques that combining chromatography and spectrometry for the determination of beta-casomorphin may be needed to better define subjects who potentially would benefit from these diets.



## 1. Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASD) comprises a heterogeneous and complex group of neurodevelopmental impairments sharing clinical symptoms in terms of communication, social interaction, behavior, and sensory perception. The therapeutic pillars are psychoeducational interventions and psychopharmacology when important behavioral alterations are present. Given the limitations in treating nuclear and peripheral symptoms of autism, many families resort to dietary and nutritional methods as components of the therapy, often without medical supervision (Owen-Smith et al., 2015).

Diet and dietary interventions have drawn considerable attention in the literature as etiopathogenic factors and therapeutic approaches to ASD, combined gluten-free and casein-free (GFCF) diets have drawn considerable attention in the literature (Dosman et al., 2013; Elder et al., 2006; Ghalicchi et al., 2016; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Knivsberg et al., 1995 and 2002; Lucarelli et al., 1995; Marí-Bauset et al., 2014; Millward et al., 2008; Mulloy et al., 2010; Navarro et al., 2015; Pedersen et al., 2013; Pusponogoro et al., 2015; Reichelt et al., 1991; Sathe et al., 2017; Whiteley et al., 1999, 2010a and 2010b), sparking controversy. Some publications report favorable results in the core or peripheral symptoms of autism after a GFCF diet: communication and language (Knivsberg et al., 1995 and 2002; Johnson et al., 2011; Lucarelli et al., 1995; Whiteley et al., 1999 and 2010a), social interaction (Knivsberg et al., 1995 and 2002; Lucarelli et al., 1995; Whiteley et al., 1999 and 2010a), stereotyped behavior (Knivsberg et al., 1995 and 2002), hyperactivity (Johnson et al., 2011; Whiteley et al., 1999 and 2010a), and gastrointestinal symptoms (Ghalicchi et al., 2016). In contrast, other studies, particularly in recent years, report an absence of behavioral improvement after such diets (Elder et al., 2006; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Navarro et al., 2015; Pusponogoro et al., 2015). Review articles on this subject highlight a lack of evidence (insufficient sample size, lack of randomization and double-blind, difficulties in measuring adherence to diet, etc.) to support the indiscriminate use of these nutritional interventions (Dosman et al., 2013; Marí-Bauset et al., 2014; Millward et al., 2008; Mulloy et al., 2010; Sathe et al 2017; Whiteley et al., 2010b). No single model explains the physiopathological relationship between autism and the effect of these diets. Likewise, there are no well-defined characteristics allowing distinguishing between those patients responding to such treatment and those patients who do not respond. Therefore, no clear consensus has been reached about the therapeutic effects achieved (core and peripheral symptoms, gastrointestinal comorbidity, epileptic or celiac comorbidity, differences in response according to age or sex, etc.). No protocols

about aspects of the risk *versus* safety that may be associated with these diets are available.

The interest in the study of peptides derived from dietary proteins lies in the digestive-immune theory of autism spectrum disorders (Reichelt et al., 1991 and 2012). In the autistic population, an increase in intestinal permeability has been postulated (Boukthir et al, 2010). This increase would lead to an impairment of the intestinal barrier function, with a possible entry of exogenous peptides of dietary origin into the general circulation (Cieślińska et al. al, 2015). This entry would result in a systemic immune response and perhaps in an effect of the absorbed peptides on the central nervous system influencing therefore the core and peripheral symptoms of autism. The intestinal degradation of beta-casein, a protein found in milk, releases bioactive peptides. The most important bioactive peptide is beta-casomorphin, so called because of its exogenous origin and its opioid activity similar to morphine. Some authors who found peptiduria in the urine of children with ASD using chromatographic techniques reported a normalization of these peptides one year after the onset of the exclusion diet (Knivsberg et al., 1995). Beta-casomorphin may also be used as an indirect marker of the intake and digestion of dietary casein (Reichelt et al., 2012).

The objective of the present study was to determine the efficacy of a GFCF diet for the treatment of ASD, and to explore the possible association between these disorders and urinary concentrations of beta-casomorphin.

## 2. Method

### 2.1. *Study Design and flow of patients*

The study design chosen was a cross-over clinical trial. For three months a diet was established containing gluten and casein (herein referred to as “normal diet”), and for another three months the established diet was a combined GFCF diet. The subjects were recruited from infant/youth mental health outpatient services, early comprehensive care centers, and parents’ associations of autistic children in the provinces of Jaen, Granada, Málaga and Almería (southern Spain) after an informative campaign (verbally and in writing) at the above mentioned centers. The patients were recruited consecutively to the study after informing the parents about the procedure and obtaining the signed consent from the parents. They were instructed on how to follow a GFCF diet by providing a guide containing practical tips and explanations on how to prepare GFCF meals before implementing the diet, lists of allowed and forbidden foods, medications and additives, examples of weekly menus and additional information

such as points of sale or official websites. Families were not financially compensated for the dietary intervention to avoid conflict of interests. This guide was prepared with the collaboration of the hospital Nutrition service personnel. The order of the intervention —that is, beginning with normal diet or GFCF diet— was assigned randomly, using a computer program. Therefore, the sample population was divided into two groups: group A began with the normal diet and ended with the GFCF diet, while group B, inversely, began with the GFCF diet and finished with the normal diet. The subjects were evaluated three times: at the onset of the study, after the first diet (3 months after the onset), and after the second diet (6 months after the onset). We have not included a washout period between the two interventions because the effects of the second intervention were measured 3 months after the end of the first intervention, without residual effects *a priori* derived from the previous intervention. Figure 1 shows a flow chart of the patients over the study period.

## 2.2. Sample Size

Assuming an  $\alpha$  error of 0.05, a  $\beta$  error of 0.09 and a 60% (Knivsberg et al., 2002) probability of improvement with the GFCF diet, as opposed to a potential 10% improvement with the normal diet, a sample population of 30 patients was deemed necessary to obtain a 1:1 ratio. Then, anticipating losses of 20% approximately, the optimal total number of patients was set at 40.

## 2.3. Inclusion Criteria

The first inclusion criterion is being diagnosed with ASD. The criteria used for the diagnosis of ASD were those proposed by the tenth edition of the International Classification of Diseases (ICD-10; World Health Organization, 1992). The diagnosis was given by physicians with extensive experience in ASD. An age range between 3 and 18 years was set at the onset of the study as the other required inclusion criterion.

## 2.4. Exclusion Criteria

We established the following exclusion criteria: patients with disorders that do not clearly meet the ASD criteria of the ICD-10; patients diagnosed with allergy to gluten or casein, which could therefore not follow the normal diet; patients who had previously excluded gluten and/or casein from their diet; patients who were likely to not follow the diet properly, for instance children with parents who were institutionalized or suffered from mental disorders. Patients

taking psychotropic medication to control certain behavioral symptoms were included in the study; in this case, a follow-up of the treatment was performed (type of medication, dosage, indications, etc.).

## 2.5. Variables and Assessment Tools

Each subject was evaluated at three time points throughout the study:

**Time 0:** Prior to any dietary intervention.

**Time 1:** Upon finishing the first dietary intervention (after the normal diet in group A and after the GFCF diet in group B).

**Time 2:** Upon finishing the second dietary intervention (after the GFCF diet in group A and after the normal diet in group B).

Several clinical-behavioral characteristics, the compliance with the intervention protocol and a biochemical determination were assessed at each time point of the study as described below.

### *Assessment of clinical-behavioral characteristics*

Each participant, accompanied by parents, was evaluated by a member of the research team, always the same person, very familiar with ASD and GFCF diets. The evaluation tools were:

The *Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) Scale* (Rimland and Edelson, 1999). This is the most specific scale used in the present study, designed to measure changes associated with treatment. It comprises four subscales: 1) speech, language and communication (14 items); 2) sociability (18 items); 3) sensory and cognitive awareness (18 items); and 4) health, physical and behavior (25 items). Each item scored from 0 to 2 in the first three subscales, and from 0 to 3 in the last one. A higher score reflects a larger severity of the symptom or the disorder evaluated. The total score of the scale may range from 0 to 175.

The *Behavioral Summarized Evaluation (Evaluation Résumé du Comportement, in French) (ERC-III) Scale* (Barthelemy et al, 1986). This assessment tool has been used to identify symptoms of autism in another international studies (Maestro et al., 1999). It is a questionnaire with 20 items that make up seven subscales: 1) autistic relapse; 2) alterations in verbal and non-verbal communication; 3) strange reactions to the surroundings; 4) alterations in motility; 5) inadequate affective reactions; 6) alteration of the major instinctive functions; and 7) alteration of attention, perception and intellectual functions. Each item is scored between 0 (absence of the symptom) and 4 (very present). The total score may range from 0 to 80.

The *Aberrant Behavior Checklist* (ABC) Scale (Aman and Singh, 1986). This scale was initially designed to assess the effects of drugs or other treatments in persons with an intellectual impairment, to study their psychopathological and behavioral alterations, and it has been used in studies with objectives similar to ours (Pusponegoro et al., 2015). It comprises 58 items, distributed in five dimensions: 1) irritability, agitation, sobbing (15 items); 2) lethargy, social withdrawal (16 items); 3) stereotyped conducts (7 items); 4) hyperactivity, disobedience (16 items); and 5) excessive talkativeness (4 items). Each item is given a score from 0 (no problem present) to 3 (important problem). The total score may range from 0 to 174.

Each of these scales presents the reliability (a psychometric property) necessary to be used at the three time point assessed.

### **Monitoring the intervention protocol**

A food frequency questionnaire was designed by the researchers to evaluate the type of food consumed and the degree of compliance with dietary requirements. The questions are referred to food intake during the previous three months. Details about food intake, the possible dietary transgressions and their frequency were recorded. The questionnaire consisted of 120 items distributed in 9 categories: 1) dairy products (17 items); 2) eggs, meats and fish (26 items); 3) vegetables (12 items); 4) fruits (16 items); 5) Legumes and cereals (10 items); 6) oils and fats (7 items); 7) pastry products (9 items); 8) drinks (14 items); 9) miscellaneous (9 items). A score from 0 (it has never been consumed) to 4 (it has been consumed every day) was assigned to each item. This protocol was completed by an interviewer who conducted interviews with the parents at the beginning of the study (to know the eating habits prior to the onset of the study), after the first dietary intervention and after the second dietary intervention.

### ***Biochemical determination***

A urine sample was collected from each participant at each time point to determine the urinary concentrations of beta-casomorphin. Urine was collected in the early morning (after an overnight fast). Subsequently, the samples were frozen at – 80 degrees Celsius and sent to the laboratory, ensuring the maintenance of the cold chain. Chromatography techniques were used for the detection of beta-casomorphin.

## 2.6. Statistical analysis

Parametric and non-parametric statistical tests were performed, as appropriate, bearing in mind the sample size and the distribution of variables. Firstly, at the onset of the study, a descriptive study was conducted for each participant.

For the continuous variables (questionnaire scores and beta-casomorphin concentration), the mean score was calculated along with the standard deviation. Bivariate correlations (Pearson  $r$  or Spearman  $r_s$  correlation, as appropriate) were used to study the association between two quantitative variables.

The group effect (A or B) and the time effect (T0, T1 or T2) were analyzed using an ANOVA test applied to repeated measurements, using the Friedman test for multiple non-parametric pairwise comparisons. At this stage, when statistically significant differences were obtained, the different time points assessed were compared two-by-two using the Wilcoxon test for pairwise comparisons. The level of significance was set at 0.05 ( $p < 0.05$ ). Data were analyzed using the statistical package SPSS 18.0.

## 3. Results

### 3.1. Analysis of the samples at the onset of the study

The initial sample population was of 28 children/adolescents diagnosed with ASD according to the ICD-10 criteria. Ages at the onset of the study ranged from 3 to 16 years old, with a mean age ( $\pm$ SD) of 8.1 ( $\pm$ 3.9) years. There was a clear majority of males (25 out of 28 [89%]). Table 1 shows demographic and clinical variables of the patients recruited.

At the beginning of the study, no significant trends were found regarding sex or age in terms of the scores on the different scales used (ATEC, ERC-III, ABC). The concentrations of beta-casomorphin in urine, at the onset, showed a significant correlation with age ( $r_s = 0.52$ ;  $p = 0.01$ ).

### 3.2. Flow of patients throughout the study

The optimal total number of patients was set at 40, although it was only possible to recruit 32 patients, 16 of them were assigned to each group. Then, four individuals assigned to group A refused to enroll in the study. Group A, at onset, consisted of 12 patients (11 males, 92%), with ages from 3 to 15, and a mean age ( $\pm$  SD) of 8.3 years ( $\pm$  4.1). Group B at onset consisted of 16 patients (14 males, 88%), aged from 3 to 16, with a mean age of 8.0 years ( $\pm$  4.0).

Throughout the intervention, five further patients (two from group A and three from B) withdrew from the study, all during the GFCF diet phase. The reported causes were: participant's refusal to continue the diet (N=4) and illness (ear and throat infections) coincides with the onset of the diet (N=1). Figure 1 shows a flow chart of the patients throughout the study.

### *3.3. Results of variables and assessment tools at T0, T1 and T2*

Before beginning any dietary intervention, all the patients underwent a first evaluation (T0). New evaluations were performed during the follow-up at 3 months (T1) and at 6 months (T2).

#### ***Results on the ATEC scale***

Regarding scores on the ATEC scale, statistically significant differences were found between the three time points, for both group A and group B. Sub-analysis of the ATEC results comparing the time points, two-by-two, gave statistically significant results only in the case of group B. In group A, the scores decreased after the normal diet and after the GFCF diet. Figure 2 shows the mean score ( $\pm$  SME) on the ATEC scale for both groups at the three time points assessed. When patients on GFCF diet from group A were considered in conjunction with patients on GFCF diet from group B, and their scores on the ATEC scale were compared with their scores when they were on a diet prior to the GFCF diet, a non-significant decrease in ATEC scores after the GFCF diet was found.

#### ***Results on the ERC-III scale***

No statistically significant differences in the ERC-III scale were found in group A among the three time points assessed. Statistically significant differences were found in ERC-III Scale scores of group B among the three time points assessed; in addition, differences were found in this group when paired analysis was performed. No differences were found when patients on GFCF diet from group A were considered in conjunction with patients on GFCF diet from group B, and their scores on the ERC-III scale were compared with their scores when they were on a diet prior to the GFCF diet. Table 2 shows scores (mean  $\pm$  SD) on the ERC-III scale based on groups and time points.

#### ***Results on the ABC scale***

Based on the ABC scale, no group showed statistically significant differences from one time point to the next. No differences were found when analyzing the two groups in conjunction (that is, comparing the GFCF diet with the immediately previous situation).

### ***Results on monitoring the protocol***

Regarding scores on the food frequency questionnaire, statistically significant differences were found among the three assessed times points and also when paired analyses were performed, for both group A and group B. When the two groups were analyzed in conjunction (ie, comparing the GFCF diet with the immediately previous situation), a significant decrease in the scores of foods that contain gluten and casein after the GFCF diet was found. Table 3 shows scores (mean  $\pm$  SD) on the food frequency questionnaire before and after the GFCF diet.

### ***Results of the concentration of beta-casomorphin in urine***

No statistically significant differences were found when the values of beta-casomorphin were compared among the three time points.

## **4. Discussion**

### ***4.1. Discussion of results***

Overall, our findings show very little behavioral changes after the GFCF diet, as gathered by the three questionnaires of reference: ATEC, ERC-III and ABC. The ATEC scale showed significant differences in both groups (separately), A and B, among the different time points, but when paired analysis were performed only one group showed differences. Scores on the ERC-III scale showed significant differences only within group B; whereas the ABC scale showed no significant differences at all.

In general, group B exhibited more behavioral changes than group A. In this group (A) the scores on the ATEC scale decreased after both types of diet. These differences may be explained by the order of intervention and an understandable desire of parents to observe some improvement (Dosman et al., 2013).

The assessment tools used (ATEC, ERC-III and ABC) might be insufficiently sensitive to minor changes, at least during the time period evaluated in the present study. Another scale known as CARS (Childhood Autism Rating Scale; Schopler et al., 1980), used in a study similar to ours (Elder et al., 2006) and correlated ( $r_s=0.71$ ;  $p<0.001$ ) with the ATEC scale (Geier et al., 2014) was used in our study, likewise did not show significant differences after an GFCF diet. The ABC scale, used in a clinical trial (Pusponegoro et al., 2015), showed no worsening of the autistic or behavioral symptoms after a supplement with gluten and casein.



The results found in the food frequency questionnaire indicate a high adherence to the diets. Table 3 shows, when both groups were analyzed together (ie, comparing the GFCF diet with the immediately previous situation), a significant decrease in the scores of foods that contain gluten and casein (dietary products, legumes and cereals, and pastry products) was found after the GFCF diet compared to the previous situation.

The absence of statistically significant differences between normal diet and GFCF diet found in the present study might suggest that the GFCF diet *per se* does not modify symptoms, an interpretation that some studies share (Elder et al., 2006; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Navarro et al., 2015; Pusponegoro et al., 2015), but not all (Ghalichi et al., 2016; Knivsberg et al., 1995 and 2002; Lucarelli et al., 1995; Pedersen et al., 2013; Reichelt et al., 1991; Whiteley et al., 1999 and 2010a).

The concentrations of beta-casomorphin in urine showed no statistically significant differences among the three time points assessed, that is, at onset, at three months and at six months. We should stress that chromatographic techniques—such as the ones used in our study— are meant for separating substances, not for their molecular identification. For this reason, there is currently an emphasis on using techniques that combine chromatography and spectrometry for the determination of these peptides (Cieslinska et al., 2015). At the time of conducting our study (year 2006) this scientific evidence was not available. Therefore, beta-casomorphin cannot be used in our study as a variable that could be correlated with behavioral changes nor as a marker of the intake of casein. At the onset of the study, we observed a positive correlation between age and the beta-casomorphin values. It may be that in older subjects, individuals are more selective about their food intake and more tolerant to casein, so that this component is either more habitual or it is metabolized differently at older age (Boukthir et al., 2010; Charman et al., 2005; Cieslinska et al., 2015; Díaz et al., 2012).

#### 4.2. *Strengths and limitations*

Among the strengths of this study, we may highlight, first, the sample size. We recruited a number of 28 patients. *A priori*, we are underpowered according to estimation referred in the method section (30 patients was deemed necessary to obtain a 1:1 ratio). At the same time, the crossover design affords the statistical advantage of duplicating, in effect, the number of patients, each one being a case and a control at the same time (reducing also intra-subject variability). Statistically, then, our population functioned as a sample of 56 patients. Most clinical trials regarding this topic involve a sample size even smaller than ours (Elder et al.,

2006; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Knivsberg et al., 1995 and 2002; Lucarelli et al., 1995; Navarro et al., 2015; Reichelt et al., 1991; Whiteley et al., 1999), except for three previous reports (Ghalichi et al., 2016; Pusponogoro et al., 2015; Whiteley et al., 2010a).

The second strength of this study is the period of the dietary intervention, established here, it was three months, being 12 months the longest one reported in the literature to date (Pedersen et al., 2013; Whiteley et al., 2010a). One previous study involving a three-month period like ours (Hyman et al., 2016) also found no changes after the diet. Another study reports results from even shorter time periods; indeed, meta-reviews (Dosman et al., 2013; Marí-Bauset et al., 2014; Millward et al., 2008; Mulloy et al., 2010; Sathe et al 2017; Whiteley et al., 2010b) point to this as one of the main limitations for this type of studies.

Finally, the fact that the evaluators were blind to the groups, A and B, with different diet orders, helped avoid any observation bias; the clinical and behavioral changes could have been due to the mere passing of time, not to the exclusion of gluten and casein (Charman et al., 2005).

The main limitation to be addressed in this study is the difficulty in monitoring a dietary intervention over a long period of time. Using beta-casomorphin as an indirect indicator of adherence to the diet may be too imprecise. In addition, neither beta-casomorphin nor the food frequency questionnaire allows us to know exactly the amounts of gluten and casein intake during the normal diet period that may explain at least in part the variability of outcomes (bias). Furthermore, the evaluation tools used (ATEC, ERC-III and ABC) depend on the information of the parents, who in turn know the diet their children are receiving. All the double-blind studies published to date (Elder et al., 2006; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Lucarelli et al., 1995; Navarro et al., 2015; Pusponogoro et al., 2015), except one (Lucarelli et al., 1995), have yielded at negative results. The main difficulty in this type of studies stems from the fact that a double blind controlled diet must be established (Elder et al., 2006; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Lucarelli et al., 1995; Navarro et al., 2015; Pusponogoro et al., 2015) and it also has to be followed for a long enough time span (Pedersen et al., 2013; Whiteley et al., 2010a).

The age of the patients of our study had a broad range, from 3 to 18 years. This fact increases the inter-individual variability regarding age, although there was no correlation at point T0 between age and the scores of the questionnaires used.

In order to identify the possible responders, it would be interesting to include, among the evaluation elements, factors such as comorbidities of gastrointestinal symptoms (Díaz et al., 2012), measurements of intestinal permeability (Boukthir et al., 2010), analysis of the microbiome, gastrointestinal enzymatic and inflammatory activity (Wang et al., 2009), and the study of pos-

sible structural and functional modifications in the brain (Dawson et al., 2012). Other variables should also be taken into account as possible genetic diagnoses, intelligence quotient, age or use of other interventions with known effects. Another aspect that should not be underestimated is the monitoring of anthropometric parameters, in order to guarantee that such diets are safe (Perrin et al., 2012). The present study is actually a pilot study that is part of a more ambitious project, where the sample population will be larger, the follow-up time will be extended (months on normal diet plus 6 months on GFCF diet) and further variables will be included, such more sophisticated techniques for the detection of beta-casomorphin, gastrointestinal comorbidity and anthropometric and analytical variables to evaluate risk and safety issues.

## 5. Conclusions

The results reported in this study suggest that a GFCF diet followed for three months does not show significant changes in the behavioral symptoms of autism or in the urinary concentrations of beta-casomorphin using chromatographic detection techniques. Previous studies on this topic (Dosman et al., 2013; Marí-Bauset et al., 2014; Millward et al., 2008; Mulloy et al., 2010; Sathe et al 2017; Whiteley et al., 2010b) establish that limited evidence lies behind the recommendation of these nutritional interventions for ASD patients. However, we need further studies that include elements of placebo and double-blindness as well as more sophisticated beta-casomorphin detection techniques in order to better define subjects who might benefit from these diets, and to elucidate what risks may be involved.

## Compliance with Ethical Standards

**Funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Acknowledgements

The authors thank Prof. Manuel Gurpegui Fernández de Legaria for his advice and suggestions during the preparation of this manuscript. They also thank Jean Louise Sanders for translating the manuscript and Nutraceutical Translations for English language editing.

**Conflict of interest:** The authors declare to have not conflict of interest with the content of the article.

**Ethical approval:** All procedures performed in studies involving human patients meet the ethical standards of the Virgen de las Nieves University Hospital and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All the patients signed an informed consent.

## References

- Aman, M. G., Singh, N. N., (1986). *Aberrant Behavior Checklist: Manual*. East Aurora, NY: Slosson Educational Publications.
- Barthélémy, C., Roux, S., Adrien, J. L., Hameury, L., Guérin, P., Garreau, B., et al., (1997) Validation of the Revised Behavior Summarized Evaluation Scale. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 27(2), 139-153.
- Boukthir, S., Matoussi, N., Belhadj, A., Mammou, S., Dlala, S. B., Helayem, M., et al., (2010) Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Tunis Medicine*, 88, 685-686.
- Cieślińska, A., Sienkiewicz-Szłapka, E., Wasilewska, J., Fiedorowicz E., Chwała, B., Moszyńska-Dumara, M., et al., (2015). 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*, 65, 6-11.
- Charman, T., Taylor, E., Drew, A., Cockerill, H., Brown, J., Baird G., (2015). Outcome at 7 years of children diagnosed with autism at age 2: predictive validity of assessments conducted at 2 and 3 years of age and pattern of symptom change overtime. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and allied disciplines*, 46(5), 500-513.
- Dawson, G., Jones, E. J., Merkle, K., Venema, K., Lowy, R., Faja, S., et al., (2012). Early behavioral intervention is associated with normalized brain activity in young children with autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 51, 1150-1159.
- Díaz-Atienza, F., Serrano Nieto, S., González-Domenech, P. J., (2012). Prevalencia de alteraciones de la conducta alimentaria, trastornos gastrointestinales e infecciones recurrentes en niños afectados de Trastornos del Espectro autista (TEA) en comparación con sus hermanos sanos. *Revista de Psiquiatría Infantil*, 29, 4.
- Dosman, C., Adams, D., Wudel, B., Vogels, L., Turner, J., Vohra, S., (2013). Complementary, holistic, and integrative medicine: autism spectrum disorder and gluten-and casein-free diet. *Pediatric Review*, 34(10), e36-41.

- Elder, J. H., Shankar, M., Shuster, J., Theriaque, D., Burns, S., Sherrill, L., (2006). The gluten-free, casein-free diet in autism: results of a preliminary double blind clinical trial. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36, 413-420.
- Geier, D. A., Kern, J. K., Geier, M. R., (2014). A Comparison of the Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) and the Childhood Autism Rating Scale (CARS) for the Quantitative Evaluation of Autism. *Journal of Mental Health Research in Intellectual Disabilities*, 6(4), 255-267.
- Ghalichi, F., Ghaemmaghami, J., Malek, A., Ostadrahimi, A., (2016). Effect of gluten free diet on gastrointestinal and behavioral indices for children with autism spectrum disorders: a randomized clinical trial. *World Journal of Pediatrics*, 12(4), 436-442.
- Hyman, S. L., Stewart, P. A., Foley, J., Cain, U., Peck, R., Morris, D. D., et al., (2016). The gluten-free/casein-free diet: a double-blind challenge trial in children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(1), 205-220.
- ICD-10 Classifications of Mental and Behavioural Disorder: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. Geneva. World Health Organization (1992).
- Johnson, C. R., Handen, B. L., Zimmer, M., Sacco, K., Turner, K., (2011). Effects of gluten free/casein free diet in young children with autism: a pilot study. *Journal of Developmental and Physical Disabilities*, 23, 213-225.
- Knivsberg, A. M., Reichet, K. L., Nodland, M., Høien, T. (1995). Autistic syndromes and diet: a follow-up study. *Scandinavian Journal of Educational Research*, 39(3), 223-236.
- Knivsberg, A. M., Reichelt, K. L., Høien, T., Nødland, M., (2002). A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutritional Neuroscience*, 5(4), 251-261.
- Lucarelli, S., Frediani, T., Zingoni, A. M., Ferruzzi, F., Giardini, O., Quintieri, F., et al, (1995). Food allergy and infantile autism. *Panminerva Medica*, 37(3), 137-141.
- Maestro, S., Casella, C., Milone, A., Muratori, F., Palacio-Espasa, F., (1999). Study of the onset of autism through home movies. *Psychopathology*, 32(6), 292-300.
- Marí-Bauset, S., Zazpe, I., Mari-Sanchis, A., Llopis-González, A., Morales-Suárez-Varela, M., (2014). Evidence of the gluten-free and casein-free diet in autism spectrum disorders: a systematic review. *Journal of Child Neurology*, 29(12), 1-10.

- Millward, C., Ferriter, M., Calver, S., Connell-Jones, G., (2008). Gluten and casein free diets for autistic spectrum disorder. *Cochrane Database of Systematic Review*, 16(2), CD003498.
- Mulloy, A., Lang, R., O'Reilly, M., Sigafoos, J., Lancioni, G. I., Rispoli, M., (2010). Gluten-free and casein-free diet in the treatment of autism spectrum disorders: a systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 4, 328-339.
- Navarro, F., Pearson, D. A., Fatheree, N., Mansour, R., Hashmi, S. S., Rhoads, J. M., (2015). Are 'leaky gut' and behavior associated with gluten and dairy containing diet in children with autism spectrum disorders? *Nutritional Neuroscience*, 18(4), 177-185.
- Owen-Smith, A. A., Bent, S., Lynch, F. L., Coleman, K. J., Yau, V. M., Pearson, K. A., et al. (2015). Prevalence and predictors of complementary and alternative medicine use in a large insured sample of children with autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 17, 40-51.
- Pedersen, L., Parlar, S., Kvist, K., Whiteley, P., Shattock, P., (2013). Data mining the ScanBrit study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders: behavioural and psychometric measures of dietary response. *Nutritional Neuroscience*, 17(5), 207-213.
- Perrin, J. M., Coury, D. L., Hyman, S. L., Cole, L., Reynolds, A. M., Clemons, T., (2012). Complementary and alternative medicine use in a large pediatric autism sample. *Pediatrics*, 130(Suppl. 2), S77-S82.
- Pusponegoro, H. D., Ismael, S., Firmansyah, A., Sastroasmoro, S., Vandenplas, Y., (2015). Gluten and casein supplementation does not increase symptoms in children with autism spectrum disorder. *Acta Paediatrica*, 104(11):e500-5.
- Rimland, B., Edelson, M., (1999). Autism Treatment Evaluation Checklist. Autism Research Institute, San Diego, CA.
- Reichelt, K. L., Knivsberg, A. M., Lind, G., Nodland, M. (1991). Probable etiology and treatment of childhood autism. *Brain Dysfunction*, 4, 308-319.
- Reichelt, K. L., Tveiten, D., Knivsberg, A. M., Bronstad, G., (2012). Peptide's role in autism with emphasis on exorphins. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 23, 18958.
- Sathe N, Andrews JC, McPheeters ML, et al. Nutritional and Dietary Interventions for Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2017;139(6): e20170346.
- Schopler, E., Reichler, R. J., DeVellis, R. F., Daly, K., (1980). Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 10, 91-103.

- Wang, L., Angley, M. T., Gerber, J. P., Young, R. L., Abarino, D. V., McKinnon, R. A., et al., (2009) Is urinary indolyl-3-acryloylglycine a biomarker for autism with gastrointestinal symptoms? *Biomarkers*, 14, 596-603.
- Whiteley, P., Rodgers, J., Savery, D., Shattock, P., (1999). A gluten-free diet as an intervention for autism and associated spectrum disorders: preliminary findings. *Autism*, 3, 45-46.
- Whiteley, P., Haracopos, D., Knivsberg, A. M., Reichelt, K. L., Parlar, S., Jacobsen, J., et al. (2010a). The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutritional Neuroscience*, 13(2), 87-100.
- Whiteley, P., Shattock, P., Carr, K., Hooper, M., Todd, L., (2010b). How could a gluten and casein-free diet ameliorate symptoms associated with autism spectrum conditions? *Autism Insights*, 2, 39-53.

**Table 1. Demographic and clinical variables according to intervention group.**

Variables	Total (n=28)	Group A (n=12)	Group B (n= 16)	<i>p</i>
<b>Sex</b>				0.61 ( $\chi^2$ )
Males	25	11	14	
Females	3	1	2	
<b>Age (Mean <math>\pm</math> SD)</b>	8.1	8.3	8.0	0.69 ( <i>t</i> de Student)
<b>Diagnosis</b>				0.40 ( $\chi^2$ )
Autism (F84.0)	13	6	7	
Atypical autism (F84.1)	1	0	1	
Asperger syndrome (F84.5)	5	2	3	
Unspecified autism (F84.9)	9	4	5	

**Table 2. Scores (mean ± SD) on the ERC-III scale according to groups and time points.**

Group	T0	T1	T2	<i>p</i> (Friedman test for related data)	<i>p</i> (Wilcoxon test for matched data)
A	35.2 ± 15.7 (n=12)	35.0 ± 16.4 (n=12)	29.6 ± 11.6 (n=10)	0.3	T0-T1: 0.52 T1-T2: 0.17
B	33.1 ± 11.5 (n=16)	27.6 ± 9.2 (n=13)	26.4 ± 7.9 (n=13)	0.01	T0-T1: 0.03 T0-T2: 0.03
All	ERC-III before exclusion diet: 31.4 ± 12.5 (n=28) ERC-III after exclusion diet: 30.7 ± 12.2 (n=23)			<i>d</i> =0.16	0.12

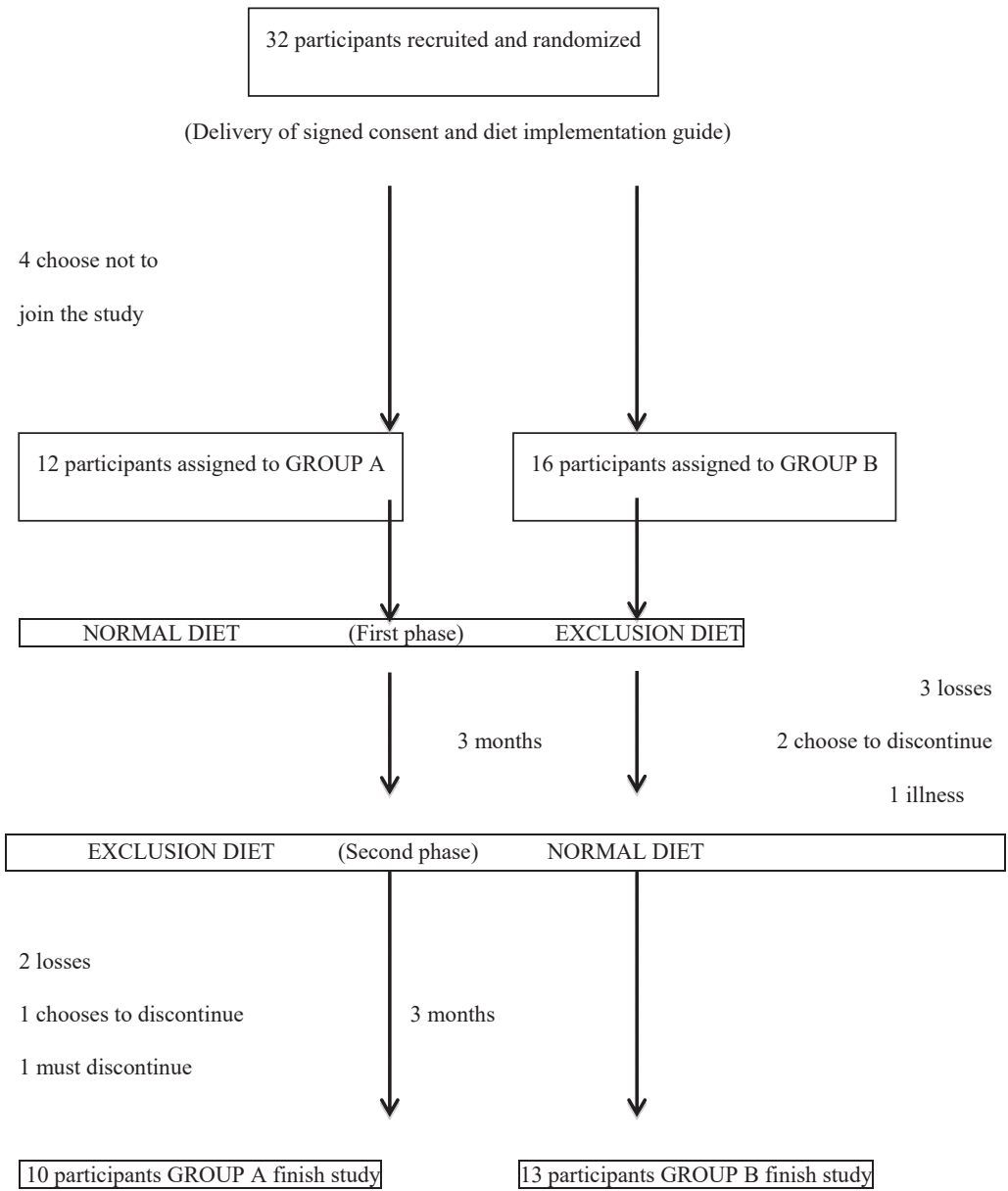
ERC-III, Evaluation Resumé du Comportement

**Table 3. Scores (mean ± SD) on the food frequency questionnaire (FFQ) before and after the GFCF diet.**

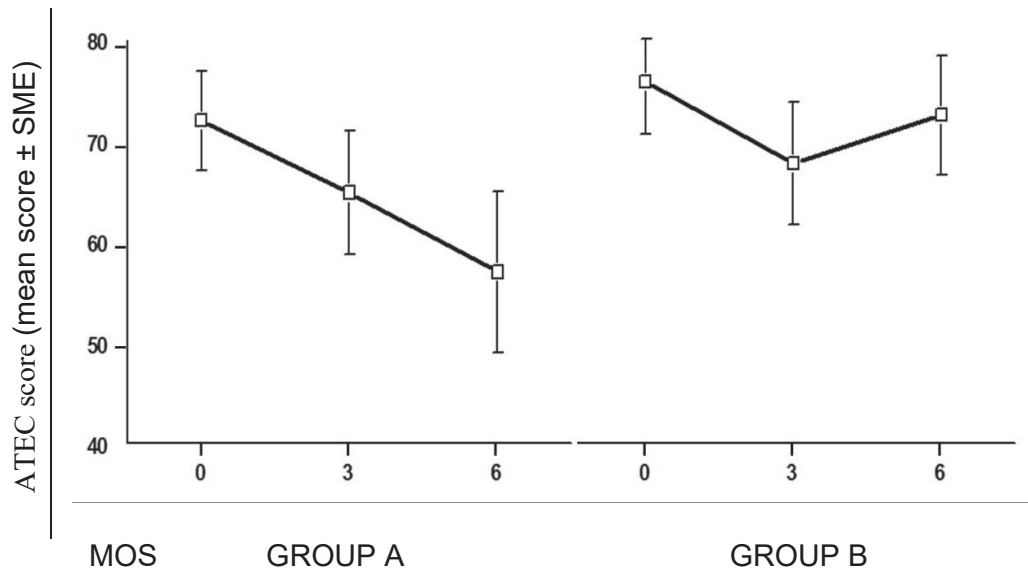
Score	Mean ± SD		<i>p</i> (Mann- Whitney U test)
	Before GFCF diet	After GFCF diet	
Total	277.5 ± 30.6	220.3 ± 21.4	0,07
Dairy products	43.1 ± 9.1	8.3 ± 1.1	0,02
Eggs, meat and fish	65.6 ± 11.4	68.2 ± 9.1	0,5
Vegetables	31.4 ± 3.3	34.7 ± 3.1	0,09
Fruits	32.5 ± 7.4	36.3 ± 5.1	0,07
Legumes and cereals	28.1 ± 5.3	5.9 ± 2.3	0,02
Oils and fats	10.5 ± 2.3	11.6 ± 3.1	0.4
Pastry products	24.3 ± 1.2	10.8 ± 3.3	0,03
Drinks	23.4 ± 2.4	25.1. ± 3.1	0,08
Miscellaneous	18.6 ± 3.5	19.4 ± 1.9	0,3



**Figure 1.** Flow of participants through the study.



**Figure 2.** Mean score ( $\pm$  Standard Mean Error) on the Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) at onset, at 3 mos. and at 6 mos. for the 12 participants in group A (first normal diet, then exclusion diet) and the other 16 in group B (first exclusion diet, then normal). Both groups showed statistically significant differences among the three evaluations; a sub-analysis of times two-by-two showed significant differences only in group B. In group A, the scores decreased after normal diet and after exclusion diet.



## ANEXO 13: GONZÁLEZ-DOMENECH ET AL. ENVIADO PARA PUBLICAR

Influence of a gluten-free casein-free diet on behavioral disturbances in children and adolescents diagnosed with autism spectrum disorder: a 12-month follow-up study

**Pablo José González-Domenech<sup>a,b</sup>, Francisco Díaz-Atienza<sup>a</sup>, Carlos García Pablos<sup>a</sup>, María Luisa Fernández Soto<sup>c</sup>, José María Martínez-Ortega<sup>b</sup>, Luis Gutiérrez-Rojas<sup>b,d</sup>**

<sup>a</sup>Child and Adolescent Mental Health Unit, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

<sup>b</sup>Department of Psychiatry and CTS-549 Research Group, Institute of Neurosciences, University of Granada, Granada, Spain

<sup>c</sup>Department of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

<sup>d</sup>Psychiatry Service, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain

### **Corresponding author:**

Luis Gutiérrez-Rojas, M. D.

Grupo de Investigación CTS-549 , Facultad de Medicina, torre A, planta 9 – E-18071 Granada, España.

Teléfono 34 958 240704. Fax 34 958 246187. E-mail: gutierrezrojasl@hotmail.com

### **Abstract**

**Introduction.** The use of alternative interventions, such as gluten-free and casein-free (GFCF) diets, is frequent due to limited therapies for Autism Spectrum Disorder (ASD). Our aims were to determine the influence of a GFCF diet on behavior disorders in children and adolescents diagnosed with ASD and the potential association with urinary beta-casomorphin concentrations. **Method.** Thirty-seven patients were recruited for this crossover trial. Each patient consumed a normal diet (including gluten and casein) for six months and a GFCF diet for another six months. The order of the intervention (beginning with normal diet or with GFCF diet) was assigned randomly. Patients were evaluated at three time-points (at the beginning of the study, after normal diet and after GFCF diet). Questionnaires regarding behavior and autism and dietary adherence were completed and urinary beta-casomorphin concentrations were determined at each time-point. **Results.** No significant behavioral changes and no association with urinary beta-casomorphin concentrations were found after

GFCF diet. **Conclusions.** A 6-month GFCF diet do not induce significant changes in behavioral symptoms of autism and urinary beta-casomorphin concentrations. Further studies with a long follow-up period similar to ours and including placebo and blinding elements are needed to identify better those respondents to GFCF diets.

**Keywords:** autism spectrum disorder, diet, gluten, casein, beta-casomorphin.

## 1. Introduction

Autism was first described more than 70 years ago (Kanner, 1943); however, treatment of these kind of disorders has not changed since then. Today, psychoeducational interventions (Reichow, Barton, Boyd & Hume, 2014) and the psychotropic management when behavioral alterations appear (Hirsch & Pringsheim, 2016) are still considered therapeutic pillars. Because of the limited effectiveness of the currently available therapies for autism spectrum disorder (ASD), many families search for alternative methods (Owen-Smith et al., 2015), often without medical supervision. The most recent studies show that up to 33% of parents hide information on nutritional treatments / supplements from the doctor responsible for monitoring their children (Trudeau, Madden, Parnell, Gibbard, & Shearer, 2019) and that up to 20% of children with ASD in Preschool age use or have used restriction diets (Rubenstein et al., 2018).

Combined gluten-free and casein-free (GFCF) diets have drawn considerable attention in the literature (Dosman et al., 2013; Elder et al., 2006; El Rashidy et al., 2017; Ghalichi, Ghaemmaghami, Malek, & Ostadrahimi, 2016; Hyman et al., 2016; Johnson, Handen, Zimmer, Sacco, & Turner, 2011; Knivsberg, Wiig, Lind, Nødland & Reichelt, 1990; Knivsberg, Reichet, Nodland, & Høien, 1995; Knivsberg, Reichelt, Høien, & Nødland, 2002; Lucarelli et al., 1995; Marí-Bauset, Zazpe, Mari-Sanchis, Llopis-González, & Morales-Suárez-Varela, 2014; Millward, Ferriter, Calver, & Connell-Jones, 2008; Mulloy et al., 2010; Navarro et al., 2015; Pedersen, Parlar, Kvist, Whiteley, & Shattock, 2013; Pusponogoro, Ismael, Firmansyah, Sastroasmoro, & Vandenplas, 2015; Sathe, Andrews, McPheeters, & Warren, 2017; Whiteley, Rodgers, Savery, & Shattock, 1999; Whiteley et al., 2010a; Whiteley, Shattock, Carr, Hooper, & Todd, 2010b) as etiopathogenic and therapeutic approaches to ASD, not without controversy. The first formal evidence of the potential effectiveness of GFCF diets in ASD was found in the early 90s by a Norwegian research team, led by Knivsberg and Reichelt, who conducted a dietary and behavioral follow-up in a group of 15 patients for a year first (Knivsberg et al., 1990) and later for four years

(Knivsberg et al., 1995). These authors found an improvement in some behaviors, a decrease in urinary peptides resulting from the metabolism of gluten and casein, and a decrease in the number of epileptic seizures after a GFCF diet. At the same time, Whiteley and Shattock in the United Kingdom published similar results on the behavioral scales of a group of 22 children who were followed for 5 months on a gluten-free diet, although in this case they did not find significant decreases in urinary levels of the peptides (Whiteley et al., 1999). However, these studies had some important limitations, such as the nonrandomized and open methodology and the lack of blinding. Subsequently, the Norwegian and British groups have performed additional studies (Knivsberg et al., 2002; Pedersen et al., 2013; Whiteley et al., 1999 and 2010a). A randomized single-blind clinical trial (Whiteley et al., 2010a) conducted in a large group of patients (n=72) with a two-year follow-up showed positive effects on behavior and development during the first 12 months of intervention, followed by a plateau effect in the following 12 months. In addition to these studies, other research groups have reported beneficial results regarding core and peripheral symptoms of autism after a GFCF diet: communication and language (Adams et al., 2018; El Rashidy et al., 2017; Ghalichi et al., 2016; Knivsberg et al., 1995 and 2002; Johnson et al., 2011; Lucarelli et al., 1995; Whiteley et al., 1999 and 2010a), social interaction (El Rashidy et al., 2017; Ghalichi et al., 2016; Knivsberg et al., 1995 and 2002; Lucarelli et al., 1995; Whiteley et al., 1999 and 2010a), stereotyped behavior (El Rashidy et al., 2017; Ghalichi et al., 2016; Knivsberg et al., 1995 and 2002), motor coordination (Knivsberg et al., 1990 y 1995), hyperactivity (Johnson et al., 2011; Pedersen et al., 2013; Whiteley et al., 1999 and 2010a), self-destructive behaviors (Knivsberg et al., 1990 and 1995; Lucarelli et al., 1995), decrease in the seizure activity (Knivsberg et al., 1990 and 1995), and gastrointestinal symptoms (Ghalichi et al., 2016). In contrast, other studies, particularly in recent years, report an absence of behavioral improvement after such diets (Elder et al., 2006; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Navarro et al., 2015; Pusponogoro et al., 2015; Seung, Rogalski, Shankar, & Elder, 2007). Several review studies have addressed exclusion diets in autism (Dosman et al., 2013; Elder, Kreider, Schaefer, & de Laosa, 2015; Lange, Hauser, & Reissmann, 2015; Marí-Bauset et al., 2014; Millward et al., 2008; Mulloy et al., 2010; Piwowarczyk, Horvath, Łukasik, Pisula, & Szajewska, 2018; Sathe et al., 2017; Whiteley et al., 2010b and 2013; Whiteley, 2015). All of them recommend caution when adopting universal conclusions about the effects of these types of dietary interventions. Some authors are more conservative (Dosman et al., 2013; Lange et al., 2015; Marí-Bauset et al., 2014) and they only recommend the diet after a diagnosis of allergy/intolerance to gluten and/or casein.

Beta-casomorphin is a peptide with opioid activity resulting from an incomplete degradation of a cow's milk protein (casein) in the intestine. The interest in the study of dietary proteins is based on the digestive-immune theory of autism (Reichelt, Knivsberg, Lind, & Nodland, 1991; Reichelt, Tveiten, Knivsberg, & Bronstad, 2012). An increase in intestinal permeability in this population has been suggested (Boukthir et al., 2010), which would lead to an impairment of the intestinal barrier with the subsequent passage of peptides derived from the diet (Cieślińska et al., 2015) to the general bloodstream. This process would trigger a systemic immune response and a likely effect on central nervous system influencing core and peripheral symptoms of autism. In the intestine, beta-casein is degraded into beta-casomorphin, named so due to its exogenous origin and its opioid activity similar to morphine. Beta-casomorphin can be used as an indirect indicator of the intake and impaired digestion of this component of the diet (Reichelt et al., 2012). A recently published study (Jarmolowska et al., 2019) showed that the concentrations of serum beta-casomorphin in children with ASD were significantly higher than the concentrations in healthy children. Some studies finding peptiduria in children with ASD has detected a normalization of the concentrations of these peptides after GFCF diet (Knivsberg et al., 1990 and 1995).

The aim of the present study was to determine the effectiveness of the GFCF diet in children and adolescents with ASD and to know its potential association with urinary concentrations of beta-casomorphin. The present study is based on a pilot study conducted few years ago by our research group (González-Domelech et al., 2019). A total of 28 children and adolescents diagnosed with ASD participated in our pilot study. These participants were subjected to an intervention with a combined gluten-free and casein-free (GFCF) diet for three months. Current literature (Pedersen et al., 2013; Pennesi and Klein, 2012; Whiteley et al., 2010a) strongly suggests that we need to increase the intervention period from three to six months and we must include risk and safety issues derived from the GFCF diets (Marí-Bauset et al., 2014).

## **2. Material and method**

### *2.1. Study design and flow of participants*

The selected design was a crossover clinical trial. Participants consumed a diet including gluten and casein (normal diet) for six months and a GFCF diet for another six months. Participants were recruited from child and adolescent psychiatry outpatient services, comprehensive care centers, and associations of parents of autistic children in the provinces of Jaen, Granada, Malaga and

Almeria (southern Spain) after an informative campaign (verbally and in writing) at the above-mentioned centers. Patients were recruited consecutively to the study after informing the parents about the procedure and obtaining the signed consent from the parents. Parents were instructed on how to offer their children a GFCF diet by providing a user's guide containing practical tips and explanations on how to prepare GFCF meals before implementing the diet, lists of allowed and forbidden foods, medications and additives, examples of weekly menus and additional information, such as points of sale or official websites regarding GFCF products. Families were not financially compensated for the dietary intervention to avoid conflict of interests. This guide was prepared with the collaboration of the Nutrition service staff at the hospital. The order of the intervention —that is, beginning with normal diet or with GFCF diet— was assigned randomly, using a computer program. Therefore, the sample population was divided into two groups: group A began with the normal diet and ended with the GFCF diet, in contrast, group B began with the GFCF diet and finished with the normal diet. The subjects were evaluated at three time points: at the beginning of the study, after the first diet (6 months after the beginning), and after the second diet (12 months after the beginning). We have not included a washout period between the two interventions because the effects of the second intervention were measured 6 months after the end of the first intervention, without residual effects derived from the previous intervention (Kumar, O'Donoghue, Stenson, & Dawson, 1979). Figure 1 shows a flow chart of the participants throughout the study period.

## *2.2. Sample size*

Assuming an  $\alpha$  error of 0.05, a  $\beta$  error of 0.09 and a 60% (Knivsberg et al., 2002) probability of improvement with the GFCF diet (compared to the 10% improvement expected for the normal diet group, for a 1:1 ratio), a sample population of 30 patients was deemed necessary. Anticipating losses of 20% throughout the study, the optimal total number of participants was set at 40.

## *2.3. Inclusion criteria*

The first inclusion criterion is being diagnosed with ASD. The criteria used for the diagnosis of ASD were those proposed by the tenth edition of the International Classification of Diseases (ICD-10; World Health Organization, 1992). The diagnosis was provided by physicians with extensive experience in ASD. An age range between 2 and 18 years was set at the onset of the study as another required inclusion criterion.

## 2.4. Exclusion criteria

We established the following exclusion criteria: patients with disorders that do not clearly meet the ASD criteria of the ICD-10; patients diagnosed with allergy to gluten or casein, which could therefore not follow the normal diet; patients who had previously excluded gluten and/or casein from their diet; patients who were likely to not follow (not adhere to) the diet properly, for instance children with parents who were institutionalized or suffering from mental disorders. Patients taking psychotropic medication to control certain behavioral symptoms were included in the study. Taking medication was not an exclusion criterion in the present study; in this case, a follow-up of the treatment was performed (type of medication, dosage, indications, etc.).

## 2.5. Variables and assessment tools

Each subject was evaluated at three time points throughout the study:

**Time 0 (T0):** Prior to any dietary intervention.

**Time 1 (T1):** Upon finishing the first dietary intervention (after the normal diet in group A and after the GFCF diet in group B).

**Time 2 (T2):** Upon finishing the second dietary intervention (after the GFCF diet in group A and after the normal diet in group B).

Several clinical-behavioral characteristics, the compliance with the intervention protocol, urinary concentrations of beta-casomorphin and risk and safety parameters derived from eating these diets were assessed at each time point. The assessment tools used are described below.

### ***Assessment of clinical-behavioral characteristics***

Each participant, accompanied by parents, was evaluated by a member of the research team, who was the same person at the three time points. The evaluator was very familiar with ASD. The evaluation tools were:

The *Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) Scale* (Rimland and Edelson, 1999). This is the most specific scale used in the present study, designed to measure changes associated with treatment. It comprises four subscales: 1) speech, language and communication (14 items); 2) sociability (18 items); 3) sensory and cognitive awareness (18 items); and 4) physical health and behavior (25 items). Each item scored from 0 to 2 in the first three subscales, and from 0 to 3 in the last one. A higher score reflects a larger severity of the symptom or disorder evaluated. The total score of the scale ranges from 0 to 175.



The *Behavioral Summarized Evaluation (Evaluation Resumé du Comportement, in French) (ERC-III) Scale* (Barthelemy et al, 1997). This assessment tool has been used to identify symptoms of autism in other international studies (Le Menn-Tripi et al., 2019; Maestro, Casella, Milone, Muratori, & Palacio-Espasa, 1999; Oneal, Reeb, Korte, & Butter, 2006). It is a questionnaire with 20 items comprising seven subscales: 1) autistic isolation; 2) impairment of verbal and non-verbal communication; 3) bizarre responses to the environment; 4) motor disturbances; 5) inappropriate emotional/affective responses; 6) primary instinctual disturbances; and 7) disturbances in attention, perception and intellectual functions. Each item is scored between 0 (absence of the symptom) and 4 (very present). The total score may range from 0 to 80.

The *Aberrant Behavior Checklist (ABC) Scale* (Aman and Singh, 1986). This scale was initially designed to assess the effects of drugs or other treatments in persons with an intellectual impairment, to study their psychopathological and behavioral alterations, and it has been used in studies with objectives similar to ours (Pusponogoro et al., 2015). It comprises 58 items, distributed in five dimensions: 1) irritability (15 items); 2) lethargy/social withdrawal (16 items); 3) stereotypic behavior (7 items); 4) hyperactivity/noncompliance (16 items); and 5) inappropriate speech (4 items). Each item is given a score from 0 (not at all a problem) to 3 (the problem is severe in degree). The total score may range from 0 to 174.

### ***Adherence to the diet protocol***

*24-hour recall.* This tool allows to measure adherence to both diets (normal diet and GFCF diet). It is one of the most used tools due to its simplicity; and this model has been previously used in other international studies for the same purpose of monitoring the management of GFCF in ASD (El-Rashidy et al., 2017; Hyman et al., 2016; Navarro et al., 2015). It consists of recalling and recording all foods and beverages consumed over the preceding 24 hours. In both the normal and the GFCF diet phase, the parents of the participants completed two questionnaires per week. After each dietary intervention, the results of the 24-hour recall were analyzed and the participants were classified into three groups: good compliants (compliance of 80-100% of the diet according to the results of the 24-hour recall), intermediate compliants (compliance with the 50-79%) and poor compliants (below 50%).

## ***Urinary concentrations of beta-casomorphin***

A urine sample was collected from each participant at each time point to determine urinary concentrations of beta-casomorphin. Urine was collected early in the morning on an empty stomach. Subsequently, the samples were frozen at - 80 °C and sent to an external laboratory for analysis, ensuring the maintenance of the cold chain. Combined spectrometry and chromatography techniques were used to identify the peptides. The equipment used for chromatographic detection was: Waters ACQUITY QSM; WATERS UPLC BEH C18 1.7um column 2.1 x 50 mm. The equipment used for spectrometric detection was: WATERS XEVO-TQS.

## ***Risk and safety parameters***

*Autoimmunity.* A screening was performed for the detection of allergy to gluten and/or casein in the first evaluation.

*Hemogram and biochemistry.* In addition to a standard analysis, the following parameters were determined in each evaluation to assess the nutritional status of the participant and to obtain safety information on the use of these diets: Calcium, Ferritin, Vitamin D, Folic Acid, Hematocrit and Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1).

*Weight-height monitoring.* In conjunction with the biochemical parameters assessing the nutritional status, the weight and height of the participants were measured at each time point to monitor these variables throughout the study, to evaluate safety aspects derived from the use of these diets.

*Survey on the history of gastrointestinal disorders and eating behavior.* It is a questionnaire designed by our research team, and has already been used in other studies (Díaz-Atienza, Serrano, González-Domenech, & García, 2012). The questionnaire was completed by the parents of the participants at the beginning of the study. On one hand, it evaluates the presence or absence of a history of 6 gastrointestinal disorders (food allergies, abdominal cramps/pain, vomiting, diarrhea, constipation and meteorism). On the other hand, it assesses the presence or absence of 13 eating disorders (difficulty incorporating solid foods, feeding limited to milk and other liquids between 12 and 15 months of age, not using a spoon at 15 months, using a baby bottle at 15 months, difficulty in incorporating new foods, previous difficulties in chewing, current difficulties in chewing, food restriction to 3-4 meals, frequent regurgitation of food, eating very slowly, inability to suction with straw, eating currently crushed or mashed food, dirt-eating).

## 2.6. Statistical analysis

Parametric and non-parametric tests have been used for the analysis as appropriate, taking into account sample size and variable distribution. A descriptive analysis of the participants was performed at the beginning of the study.

Mean and standard deviation (SD) were calculated for continuous variables (questionnaire scores and concentrations of beta-casomorphin at each of the three time points). Bivariate correlations (Pearson  $r$  correlation or Spearman  $r_s$ , as appropriate) were used for the study of the association between two quantitative variables.

The group (A or B) and time (T0, T1 or T2) effects were analyzed using the Friedman ANOVA for repeated measures through Friedman test for multiple paired non-parametric comparisons. At this point, when statistically significant differences were obtained, the time points were compared two by two using the Wilcoxon test for paired data.

P values below 0.05 ( $p < 0.05$ ) were considered significant. Data were analyzed using the statistical package SPSS 20.

## 3. Results

### 3.1. Sample analysis at the beginning of the study

The initial sample consisted of 37 children and adolescents diagnosed with ASD according to ICD-10. The age range was 2-18 years, being the mean ( $\pm$  SD) 8.9 years ( $\pm$  4.0). Age (at T0) showed a significant ordinal correlation with the ATEC scale ( $r_s = -0.36$ ;  $p = 0.027$ ), but not with the ERC-III scale ( $r_s = -0.03$ ;  $p = 0.86$ ) nor with the ABC scale ( $r_s = -0.23$ ;  $p = 0.18$ ), despite these scales show a high correlation among them [ATEC with ERC-III,  $r_s = 0.85$  ( $p < 0.001$ ); ATEC with ABC,  $r_s = 0.60$  ( $p < 0.001$ ); ERC-III with ABC,  $r_s = 0.60$  ( $p < 0.001$ )]. A male predominance was found [29 out of 37 participants (78%)]. No significant differences in sex were found in the scores of the scales used (ATEC, ERC-III, ABC). Those who at the beginning of the study used a psychotropic drug showed significantly higher scores in the mean values of the scales used (ATEC, ERC-III, ABC). Urinary concentrations of beta-casomorphin at the beginning of the study showed a significant correlation with age ( $r_s = 0.41$ ;  $p = 0.016$ ). Table 1 shows demographic and clinical variables for each intervention group (A and B).

### 3.2. Flow of participants throughout the study

A total of 40 participants were recruited, 20 participants were assigned to each group. After signing the informed consent and obtaining the user's guide for the implementation of the GFCF diet, 3 participants assigned to group B refused to enroll. At the beginning of the study, group A had 20 participants (13 males, 65%), with ages between 3 and 16 years, being mean age ( $\pm$  SD) of 9.1 ( $\pm$  3.7) years. Group B consisted of 17 participants (16 males, 94%) with ages between 2 and 18 years, being mean age ( $\pm$  SD) of 8.8 year ( $\pm$  4.4). During the first phase of the study, 4 participants in group A (two individuals diagnosed with gluten allergy and two individuals who refused to continue the study) and 2 participants in Group B (two individuals diagnosed with casein allergy) were lost to follow-up. In the second phase of the study, 2 participants from group A (two individuals who refused to continue the study) were lost to follow-up. A total of 14 participants from Group A completed the study, and a total of 15 participants from Group B completed the study. Figure 1 shows a flow chart of participants throughout the study.

### 3.3. Results of the variables and evaluation tools at T0, T1 and T2

Prior to any type of dietary intervention, all participants underwent a first evaluation (T0). New evaluations were performed after 6 (T1) and 12 (T2) months of follow-up.

#### **Results of the ATEC scale**

On the ATEC scale, none of the groups showed statistically significant differences between the three time points (Table 2). In both groups, scores of T1 and T2 were lower than scores of T0. The decrease in both groups was larger in T1 than in T2 (that is, after the GFCF for group B and, surprisingly, after the normal diet for group A). When both groups were analyzed together ( $n=29$ ; that is, comparing the GFCF with the immediately previous situation), a non-significant decrease in the scores after the GFCF was found, with a very small effect size ( $d=0.10$ ).

#### **Results of the ERC-III scale**

On the ERC-III scale, group A showed statistically significant differences between the three time points (Figure 2). A significant decrease in the scores between T0 and T2 (after the GFCF) was found when times points were analyzed two by two. Group B showed a progressive (not significant) decrease in the ERC-III scale score over time; that is, the decrease recorded after the GFCF (T1) continued (not significantly) after the normal diet (T2). When both groups

were analyzed together (n=29; that is, comparing the GFCF with the immediately previous situation), a non-significant decrease in the scores after the GFCF was found, with a very small effect size (d=0.16).

### ***Results of the ABC scale***

On the ABC scale, none of the groups showed significant differences between the three time points. Group A showed a decrease (not significant) in the score between T0 and T1 (after normal diet) and, contrary to expectations, a higher score in T2 (after GFCF) than in T0 and in T1 was found. Group B showed a progressive (not significant) decrease in the ABC scale score over time; that is, the decrease recorded after the GFCF (T1) continued (also unexpectedly) after the normal diet (T2). When both groups were analyzed together (n=29; that is, comparing the GFCF with the immediately previous situation), a non-significant increase in the scores after the GFCF was found, with a very small effect size (d=0.07).

### ***Results of adherence to the diet***

The results of adherence to dietary interventions (normal diet and GFCF) measured through the 24-hour recall show that 82.8% of the sample were good compliants, 13.8% were intermediate compliants and the remaining 3.4% were poor compliants (Figure 3). The results of the scales used (ATEC, ERC-III, ABC) did not vary when the analysis was limited to the 24 participants who were good compliants.

### ***Results of beta-casomorphin concentrations in urine***

After GFCF, there was a non-significant decrease in beta-casomorphin concentrations in urine (Table 3).

### ***Results of the risk and safety parameters***

#### ***Autoimmunity***

Two individuals with gluten allergy and two individuals of casein allergy were diagnosed at the first time point (Figure 1).

#### ***Hemogram and biochemical analysis***

The nutritional variables analyzed (calcium, vitamin D, ferritin, folic acid, IGF-1 and hematocrit) showed no significant differences when compared between before and after the GFCF diet (Table 3).

#### ***Results of weight-height monitoring***

No significant differences were found in body mass index when comparing before and after the GFCF diet (Table 3).

### *History of gastrointestinal and eating disorders*

A total of 76.5% of the surveyed sample (n=34) showed a history of gastrointestinal disorders, being abdominal distress (41.2%) the most frequent disorder. Whereas 88.2% of the surveyed sample (n=34) showed a history of eating disorders, being the difficulty to incorporate new foods (52.9%) the most frequent disorder. The results of the scales used (ATEC, ERC-III, ABC) show no changes when the analysis was performed only on the 27 participants presenting with a history of gastrointestinal or eating disorders.

## **4. Discussion**

### *4.1. Discussion of the results*

Overall, our results show minimal changes in behavioral disorders after a GFCF diet determined using the ATEC, ERC-III and ABC scales. Only the ERC-III scale and only group A showed significant results after the GFCF diet, but the effect size was very small (Figure 2). A decrease (non-significant) in the scores on the scales used after the GFCF diet was found when the effect of GFCF was measured by joining participants of groups A and B, that is, when the GFCF diet (T1 for group B and T2 for group A) was compared with the immediately previous situation (T0 for group B and T1 for group A).

Some findings were found against expectations. In group A, the ATEC scale scores decreased compared to the baseline situation (T0) after both the normal diet (T1) and the GFCF diet (T2) (Table 2). A negative correlation between the ATEC scale and age has been previously reported (Mahapatra et al., 2018), which could explain this decrease in the ATEC scale scores over time. In our study, the age variable (in T0) showed a significant ordinal correlation with the ATEC scale ( $r_s = -0.36$ ;  $p = 0.027$ ), but not with the ERC-III scale ( $r_s = -0.03$ ;  $p = 0.86$ ) nor with the ABC scale ( $r_s = -0.23$ ;  $p = 0.18$ ), although the scales show a high correlation with each other [ATEC with ERC-III,  $r_s = 0.85$  ( $p < 0.001$ ); ATEC with ABC,  $r_s = 0.60$  ( $p < 0.001$ ); ERC-III with ABC,  $r_s = 0.60$  ( $p < 0.001$ )]. These unexpected results on the ATEC scale could also be explained by the order of the intervention in group A (first normal diet) and the expected desirability of parents to find an improvement in their children soon (Dosman et al., 2013). In group B and for the ERC-III and ABC scales, the scores decreased after the exclusion diet (T1) and after the normal diet (T2) (Figure 2). In this case and given the order of intervention in group B (first GFCF), this could be due to the fact that a certain passiveness was maintained in restrictive dietary care after the improvement achieved in T1. A third and final unexpected result occurred in

group A for the ABC scale, where the scores not only decreased after the normal diet (T1), but they also increased again, even above T0 after the GFCF (T2). Perhaps this is the most unexpected and controversial result of all, since it involves a finding completely contrary to our hypothesis: an improvement after the normal diet and an aggravation after the GFCF diet. First, it should be noted that these results were not statistically significant and that the range of scores was very narrow between the three time points ( $43.1 \pm 22.4$  in T0;  $37.9 \pm 21.7$  in T1; and  $43.6 \pm 21.5$  in T2). Furthermore, the ABC scale is the least specific of three tools used by us to assess the behavioral symptoms of autism, although other authors have used it in similar studies (Navarro et al., 2015; Pusponogoro et al., 2015). Regarding this finding, we should consider the possibility that the participants would worsen during the GFCF period due to the restriction of foods due to the withdrawal of gluten and casein from the diet, added to the selectivity in the choice of meals and eating disorders described in the autistic population (Díaz-Atienza et al., 2012). It should be noticed that this phenomenon of "paradoxical effect" was not found in group B nor in the other scales used.

The lack of conclusive results in our research can be attributed to several causes that are discussed below.

First, the evaluation tools used (ATEC, ERC-III and ABC) may not be sufficiently sensitive to change, at least during the assessed period. However, these scales have been used in other studies on nutritional and dietary interventions in ASD (Adams et al., 2018; Amminger et al., 2007; Bent, Bertoglio, Ashwood, Bostrom, & Hendren, 2011; Bent, et al., 2014; Bertoglio, Jill James, Deprey, Brule, & Hendren, 2010; Grimaldi et al., 2018). Another evaluation scale, the Childhood Autism Rating Scale (CARS) described by Schopler, Reichler, DeVellis & Daly (1980), was used in a crossover study (Elder et al., 2006) similar to ours and correlated ( $r_s = 0.71$ ;  $p < 0.001$ ) with the ATEC scale (Geier, D. A., Kern, & Geier, M. R., 2014) used in our study, but it showed no differences after the GFCF diet too.

Secondly, the lack of conclusive results after GFCF diet could be explained by the lack of adherence to the diet. The results of the adherence to the diet measured through the 24-hour recall showed that 82.8% of the sample were good compliants (they followed the intervention modalities in more than 80%) (Figure 3). The results of the scales used (ATEC, ERC-III, ABC) did not vary when the analysis was restricted to the 24 participants who were good compliants.

Therefore, if it is ruled out that the absence of significant differences in our study could be due to the lack of sensitivity of our assessment tools to change or due to problems in adherence to diet. Our results suggest that the GFCF diet does not lead to changes in symptoms, in contrast with the findings of other



studies (El Rashidy et al., 2017; Ghalichi et al., 2016; Knivsberg et al., 1990, 1995 and 2002; Lucarelli et al., 1995; Pedersen et al., 2013; Whiteley et al., 1999 and 2010a), but in consistency with most of the latest published studies (Elder et al., 2006; González-Domenech et al., 2019; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Navarro et al., 2015; Pusponogoro et al., 2015; Seung et al., 2007).

Urinary concentrations of beta-casomorphin decreased after the GFCF diet, but this change was not significant. Due to technical laboratory issues, it was impossible to obtain the result for all the samples (Table 3). Some studies have suggested that urinary concentrations of beta-casomorphin are higher in children with autism (Reichelt and Knivsberg, 2003; Sokolov et al., 2014; Tveiten, Finvold, Andersson & Reichelt, 2014). Sokolov et al. (2014) found a positive correlation between concentrations of beta-casomorphin and severity of behavior disorders. In our study, no relationship was found between urinary concentrations of beta-casomorphin at the beginning of the study and the severity of behavioral symptoms measured using the ATEC, ERC-III and ABC scales (Table 1). From our results, we cannot draw conclusions about whether the concentrations of opioid peptides are higher in the autistic population than in the non-autistic population, because our crossover design uses the patient as a control. Nevertheless, our findings should be compared with the results of those studies that have performed measurements of opioid peptides before and after a GFCF diet. Another crossover clinical trial similar to ours (Elder et al., 2006) also showed no significant differences in the urinary concentrations of gluten and casein-derived peptides (gluteomorphine and casemorphine, respectively) between the phase of normal diet and the phase of GFCF diet. However, the urinary concentrations of peptides were normalized after the GFCF diet in the study conducted by Knivsberg et al. (1990 and 1995). One of the main issues surrounding the determination of beta-casomorphin concentrations is the technique used to analyze these substances. Classically, the determination of peptiduria was performed using chromatographic techniques (Reichelt, Saelid, Lindback, & Boler, 1986; Reichelt et al, 1991). However, these techniques are separation tools but they are useless for molecular identification, so more recent studies have used combined chromatography and spectrometry techniques, such as those used in our study, for the determination of these peptides (Cass et al., 2008; Dettmer, Hanna, Whetstone, Hansen, & Hammock, 2007; Hunter, O'Hare, Herron, Fisher, & Jones, 2003) or have tried to determine other substances derived from other peptides or amino acids such as glycine (Dalton et al., 2017). The current emphasis on the investigation of opioid peptides in autism lies in studying indirect markers of the biological activity of these proteins (Cieślińska et al., 2015; Jarmolowska et al, 2019), such as the enzyme dipeptidyl peptidase-4 (which is responsible for hydrolyzing be-



ta-7-casomorphin in the intestine) or the opioid receptors  $\mu$  (to which these substances bind in the brain).

Some authors have suggested that the use of elimination diets may cause health risks due to certain nutritional deficiencies, mainly calcium deficiency after exclusion of dairy products (Hediguer et al., 2008; Konstantynowicz et al., 2007) which could consequently alter bone growth (Monti et al., 2007; Neumeyer, Gates, Ferrone, Lee, & Misra, 2013). Only few clinical trials conducted with GFCF diets in autistic patients have determined risk and safety variables (Elder et al., 2006; El-Rashidy et al., 2017; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Knivsberg et al., 2010a) and none of them have shown apparent side effects to date. Our results are consistent with those studies, since we show that GFCF diets do not involve apparent health risks measured through the nutritional and anthropometric variables analyzed (calcium, vitamin D, ferritin, folic acid, IGF-1, hematocrit and body mass index) (Table 3).

The first formal description of autistic symptoms, provided by Leo Kanner in 1943, already mentioned gastrointestinal symptoms in some of the cases. In our sample, 76.5% of participants presented a history of gastrointestinal disorders. The most frequent was abdominal pain/colic, present in approximately half of the cases (41.2%). It has been suggested that the feeling of pain in children with ASD could be expressed through behavioral disorders such as irritability or oppositionism because of the difficulties in this population for the recognition and communication of emotions (Nygaard, 2010). There are favorable publications in patients with gastrointestinal comorbidity (diarrhea, constipation) suggesting a potential connection between intake of certain foods, such as dairy products, and the presence of gastrointestinal symptoms (Boukthir et al., 2010; Diaz-Atienza et al., 2012). In our sample, the results of the scales used (ATEC, ERC-III, ABC) did not vary when the analysis was limited to the 27 participants who had either a history of gastrointestinal or eating disorders. Furthermore, Hans Asperger described the syndrome that bears his name in 1961 and established a relationship between diets and autism and he has also associated the syndrome with celiac disease (Asperger, 1961). In our study, two cases of gluten allergy and two cases of casein allergy were diagnosed at T0, all of them were excluded from the study because they could not eat the normal diet. It is possible that, in addition, there were participants with non-celiac gluten sensitivity and/or intolerance to cow's milk proteins that were not detected by conventional immunological tests, hence the importance of finding specific biochemical markers in the autistic population, especially in those cases with gastrointestinal comorbidity (Catassi et al., 2013).

Finally, the results of our research show that 88.2% of the sample surveyed ( $n = 34$ ) presented a history of eating disorder, the most frequent of them was

the difficulty of incorporating new foods, present in 18 (52.9%) out of the 34 participants surveyed, which reinforces the idea of food selectivity and inherent restriction in the autistic syndrome (Cornish, 2002).

#### 4.2. *Strengths and limitations*

One of the main contributions of our research is the use of a cross-design methodology in the follow-up of a large group of patients (n=37) undergoing a GFCF diet for a long period of time (6 months). Our cross-over methodology was inspired by a study published 15 years ago by a group of North American researchers (Elder et al., 2006) who did not find conclusive results but suggested in their conclusions to increase the intervention period (6 + 6 weeks) and the sample size (n=14). The cross design reduces the variability between subjects (each participant is, at the same time, a patient and a control) and allows performing a statistical analysis as if we had twice the sample. The sample was divided into two groups (A and B), each group with a different order of dietary intervention, to control the evolutionary bias: the clinical and behavioral changes found in the subjects could be due to the passage of time and not due to the exclusion of gluten and casein (Charman et al., 2005).

Regarding the large group of recruited participants, it should be noted that 30 participants were needed based on the sample size calculation, which was based (Knivsberg et al., 2002) on a 50% advantage among 10 participants with GFCF diet and another 10 with normal diet (in parallel design) and with an effect size (Cohen's d) of 1.13. Although the sample size could also be considered *a priori* as a study limitation, several factors should be taken into account. Most clinical trials concerning this topic have used sample sizes smaller than ours (Elder et al., 2006; Hyman et al., 2016; Johnson et al., 2011; Knivsberg et al., 1990, 1995 and 2002; Lucarelli et al., 1995; Navarro et al., 2015; Seung et al., 2007; Whiteley et al., 1999). Moreover, and stated above, the cross design of the study provides the statistical advantage of as if the number of participants were doubled (each subject is, at the same time, case and control), so it is as if we have 74 participants in our study.

Many researchers in this area of study have tried to design clinical trials with a minimum GFCF period set at 3 months, based on evidence that gluten residues and their bio-products remain active in the intestine of people affected by celiac disease up to 12 weeks after removing gluten from the diet (Kumar et al., 1979). Our research group, based on this statement, launched a clinical trial of similar characteristics to this one years ago with a GFCF intervention period established in 3 months, which also did not find conclusive results after the GFCF (González-Domenech et al., 2019). The launch of the present study,

with an intervention with GFCF diet for 6 months, was prompted by the results of the ScanBrit study (Pedersen et al., 2013; Whiteley et al., 2010a), that showed improvements during the first year and a plateau effect during the second year of intervention with GFCF diet. The ScanBrit study has the longest follow-up period to date, 24 months, and the authors suggest that an intervention period of at least 6 months is necessary to be able to reasonably evaluate the response to a GFCF diet. Pennesi and Klein (2012) found within the information provided by the parents that the most relevant results were described after 6 months with a GFCF diet. The remaining studies available to date, except one of them with the same duration as ours and that also found no significant changes after the diet (Hyman et al., 2016), have shorter follow-up periods, which has been pointed out in review studies as one of the main limitations for this type of research (Dosman et al., 2013; Marí-Bauset et al., 2014; Millward et al., 2008; Mulloy et al., 2010; Pedersen et al., 2013; Piwowarczyk et al., 2018; Sathe et al., 2017; Whiteley et al., 2010b).

We have not included a washing period between the two interventions because the effects of the second intervention were measured 6 months after the end of the first intervention, without the presence of residual effects derived from the previous intervention (Kumar et al., 1979).

Our study included children and adolescents as participants. Some studies on GFCF diets in autism avoid including adolescents (Whiteley et al., 2010) to prevent the influence of behavioral changes occurring with the onset of puberty (Gillberg and Schaumann, 1981). The age of our participants, therefore, included a broad spectrum (between 2 and 18 years old). This fact increases the interindividual variability in relation to the age variable, which (in T0) showed a significant correlation with the ATEC scale but not with the ERC-III or ABC scales. The correlation between the ATEC scale and age, as above mentioned, is described in the scientific literature (Mahapatra et al., 2018). Both groups started from a similar distribution in terms of the age of their participants (Table 1).

Another limitation of this study is the difficulty of monitoring the dietary intervention for such a long period of time. Based on the scientific literature, families of people affected by ASD often find serious difficulties in properly following dietary recommendations (Adams et al., 2018). A study led by Johnson et al. (2011, United States) used the 24-hour recall to monitor adherence to the GFCF diet (intervention group) and to the normal diet (control group). More dietary errors were found in the intervention group than in the control group and the errors were more frequent at the end of the intervention in the intervention group, reflecting the parents' difficulty in establishing and maintaining this type of diets and the decrease in interest over time, especially if no obvious improvements were found (Pennesi and Klein, 2012). We should keep

in mind that dietary errors can also occur during the normal diet period; it is well known by the parents of participants of this type of studies that the objective of the GFCF diet period is to completely exclude foods containing gluten and casein. However, the amounts of gluten and casein eaten may vary among participants during the normal diet, and the intake of these components could be decreased, especially if an improvement was found during the GFCF diet. This phenomenon occurred in our study, where the scores of the ERC-III and ABC questionnaires for group B decreased after the GFCF (T1) and continued to decrease (non-significantly) after the normal diet (T2) (Figure 2). Finally, we must also consider the possibility of dietary errors outside the scope of the main caregivers, for example, being at the home of grandparents, with other relatives or friends, or at birthday parties (Pennesi and Klein, 2012).

All double-blind studies performed to date (Elder et al., 2006; Hyman et al., 2016; Navarro et al., 2015; Pusponogoro et al., 2015a) except one (Lucarelli et al., 1995), have shown negative results after a GFCF diet, that is, no differences were found between GFCF diet and control diet. One of the main difficulties in this type of study is, therefore, in establishing a dietary intervention that, on the one hand, is double-blind controlled but also, on the other hand, is conducted for a sufficient period of time (Pedersen et al., 2013; Whiteley et al., 2010a).

## 5. Conclusions

This study suggests that a GFCF diet followed for 6 months does not show significant changes in the behavioral symptoms of autism or in urinary concentrations of beta-casomorphin.

Previous studies concerning this topic (Dosman et al., 2013; Marí-Bauset et al., 2014; Millward et al., 2008; Mulloy et al., 2010; Sathe et al 2017; Whiteley et al., 2010b) establish that there is limited evidence to recommend the use of these nutritional interventions in ASD. Further clinical trials including a sufficient follow-up period similar to ours and including a double-blind methodology (main limitation of our study) are needed. The following evaluation elements should be included to identify potential responders: comorbidities of gastrointestinal symptoms (Diaz-Atienza et al., 2012), measurements of intestinal permeability (Boukthir et al., 2010), examinations of intestinal bacterial populations, gastrointestinal enzymatic and inflammatory activity (Wang et al., 2009), in addition to the study of possible structural and functional changes at the brain level (Dawson et al., 2012).

## 6. References

- Adams, J. B., Audhya, T., Geis, E., Gehn, E., Fimbres, V., Pollard, E. L.,...Quig DW (2018). Comprehensive Nutritional and Dietary Intervention for Autism Spectrum Disorder. A Randomized, Controlled 12-Month Trial. *Nutrients*, 10(3), 369.
- Aman, M. G., & Singh, N. N., (1986). *Aberrant Behavior Checklist: Manual*. East Aurora, NY: Slosson Educational Publications.
- Amminger, G. P., Berger, G. E., Schäfer, M. R., Klier, C., Friedrich, M. H., & Feucht, M. (2007). Omega-3 fatty acids supplementation in children with autism: a double-blind randomized, placebo-controlled pilot study. *Biol Psychiatry* 61: 551–553.
- Asperger H (1961). Psychopathology of children with celiac disease. *Annals of Paediatrics*, 197, 346–351.
- Barthélémy, C., Roux, S., Adrien, J. L., Hameury, L., Guérin, P., Garreau, B.,...Le-lord, G. (1997) Validation of the Revised Behavior Summarized Evaluation Scale. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 27(2), 139-153.
- Bent, S., Bertoglio, K., Ashwood, P., Bostrom, A., & Hendren, R. L. (2011). A pilot randomized controlled trial of omega-3 fatty acids for autism spectrum disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 41(5), 545–554.
- Bent, S., Hendren, R. L., Zandi, T., Law, K., Choi, J-E., Widjaja, F.,...Law, P. (2014). Internet-based, randomized, controlled trial of omega-3 fatty acids for hyperactivity in autism. *Journal of American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 53(6), 658–666.
- Bertoglio, K., Jill James, S., Deprey, L., Brule, N., & Hendren, R. L. (2010). Pilot study of the effect of methyl B12 treatment on behavioral and biomarker measures in children with autism. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(5), 555–560.
- Boukthir, S., Matoussi, N., Belhadj, A., Mammou, S., Dlala, S. B., Helayem, M.,... Abdennebi, M. (2010). Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Tunis Medicine*, 88, 685-686.
- Cass, H., Gringras, P., March, J., McKendrick, I., O’Hare, A. E., Owen, L., & Pollin, C. (2008). Absence of urinary opioid peptides in children with autism. *Archives of Disease in Childhood*, 93(9), 745-750.
- Catassi, C., Bai, J. C., Bonaz, B., Bouma, G., Calabró, A., Carroccio, A.,...Fasano, A. (2013). Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. *Nutrients*, 5, 3839-3853.
- Cieślińska, A., Sienkiewicz-Szłapka, E., Wasilewska, J., Fiedorowicz E., Chwała, B., Moszyńska-Dumara, M.,...Kostyra, E. (2015). Influence of candidate poly-

morphisms on the dipeptidyl peptidase IV and  $\mu$ -opioid receptor genes expression in aspect of the  $\beta$ -casomorphin-7 modulation functions in autism. *Peptides*, 65, 6-11.

- Charman, T., Taylor, E., Drew, A., Cockerill, H., Brown, J., & Baird G., (2015). Outcome at 7 years of children diagnosed with autism at age 2: predictive validity of assessments conducted at 2 and 3 years of age and pattern of symptom change overtime. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and allied disciplines*, 46(5), 500-513.
- Cornish, E. (2002). Gluten and casein free diets in autism: a study of the effects on food choice and nutrition. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 15(4), 261-269.
- Dalton, N. R., Chandler, S., Turner, C., Charman, T., Pickles, A., Simonoff, E., & Baird, G. (2017). Measurement of urine indolylacroylglycine is not useful in the diagnosis or dietary management of autism. *Autism Research*, 10(3), 408-413.
- Dawson, G., Jones, E. J., Merkle, K., Venema, K., Lowy, R., Faja, S., & Webb, S. J. (2012). Early behavioral intervention is associated with normalized brain activity in young children with autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 51(11), 1150-1159.
- Dettmer, K., Hanna, D., Whetstone, P., Hansen, R., & Hammock, B. D. (2007). Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(8), 1643-1651.
- Díaz-Atienza, F., Serrano, S., González-Domenech, P. J., & García, C. (2012). Prevalence of feeding disorders, gastrointestinal disorders and recurrent infections in children with Autism Spectrum Disorders (ASD) compared with their healthy siblings. *Revista de Psiquiatría Infantil*, 29(4), 11-16.
- Dosman, C., Adams, D., Wudel, B., Vogels, L., Turner, J., & Vohra, S., (2013). Complementary, holistic, and integrative medicine: autism spectrum disorder and gluten-and casein-free diet. *Pediatric Review*, 34(10), e36-41.
- Elder, J. H., Shankar, M., Shuster, J., Theriaque, D., Burns, S., & Sherrill, L., (2006). The gluten-free, casein-free diet in autism: results of a preliminary double blind clinical trial. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36, 413-420.
- Elder, J. H., Kreider, C. M., Schaefer, N. M., & de Laosa, M. B. (2015). A review of gluten- and casein-free diets for treatment of autism: 2005-2015. *Nutritional Dietary Supplements*, 7, 87-101.

- El-Rashidy, O., El-Baz, F., El-Gendy, Y., Khalaf, R., Reda, D., & Saad, K., (2017). Ketogenic diet versus gluten free casein free diet in autistic children: a case-control study. *Metabolic Brain Disease*, 32(6), 1935-1941.
- Geier, D. A., Kern, J. K., & Geier, M. R., (2014). A Comparison of the Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) and the Childhood Autism Rating Scale (CARS) for the Quantitative Evaluation of Autism. *Journal of Mental Health Research in Intellectual Disabilities*, 6(4), 255-267.
- Ghalichi, F., Ghaemmaghami, J., Malek, A., & Ostadrahimi, A., (2016). Effect of gluten free diet on gastrointestinal and behavioral indices for children with autism spectrum disorders: a randomized clinical trial. *World Journal of Pediatrics*, 12(4), 436-442.
- Gillberg, C., & Schaumann, H. (1981). Infantile autism and puberty. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 11, 365–371.
- González-Domenech P. J., Díaz, F., García, C., Serrano, S., Herreros, O., Gutierrez-Rojas, L., & Martínez-Ortega, J. M., (2019). Influence of a Gluten-free, Casein-free Diet on Behavioral Disturbances in Children and Adolescents Diagnosed with Autism Spectrum Disorder: A 3-month Follow-up Pilot Study. *Journal of Mental Health Research in Intellectual Disabilities*. Published online August 30. doi:10.1080/19315864.2019.1654574
- Grimaldi, R., Gibson, G. R., Vulevic, J., Giallourou, N., Castro-Mejía, J. L., Hansen, L. H.,...Costabile, A. (2018). A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome* 6(1), 133.
- Hediguer, M. L., England, L. J., Molloy, C. A., Yu, K. F., Manning-Courtney, P., & Mills, J. L. (2008). Reduced bone cortical thickness in boys with autism or autism spectrum disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 38(5), 848-856.
- Hirsch, L.E., & Pringsheim, T. (2016). Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016, 26(6), CD009043.
- Hunter, L. C., O'Hare, A., Herron, W. J., Fisher, L. A., & Jones, G. E. (2003). Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 45, 121-128.
- Hyman, S. L., Stewart, P. A., Foley, J., Cain, U., Peck, R., Morris, D. D.,...Smith, T. (2016). The gluten-free/casein-free diet: a double-blind challenge trial in children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(1), 205-220.
- ICD-10. (1992). Classifications of mental and behavioural disorder: Clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva, Switzerland: World Health Organization.



- Jarmolowska, B., Bukalo, M., Fiedorowicz, E., Cieslińska, A., Kordulewska, NK., Moszyńska, M.,...Kostyra, E., (2019). Role of Milk-Derived Opioid Peptides and Proline Dipeptidyl Peptidase-4 in Autism Spectrum Disorders. *Nutrients*, 11(1), E87.
- Johnson, C. R., Handen, B. L., Zimmer, M., Sacco, K., & Turner, K., (2011). Effects of gluten free/casein free diet in young children with autism: a pilot study. *Journal of Developmental and Physical Disabilities*, 23, 213-225.
- Kanner, L. (1971). Follow-up study of eleven autistic children originally reported in 1943. *Journal of Autism & Childhood Schizophrenia*, 1, 119–145.
- Knivsberg, A. M., Reichelt, K. L., Høien, T., & Nødland, M., (2002). A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutritional Neuroscience*, 5(4), 251-261.
- Knivsberg, A. M., Reichelt, K. L., Nodland, M., & Hoiien, T. (1995). Autistic syndromes and diet: a follow-up study. *Scandinavian Journal of Educational Research*, 39(3), 223-236.
- Knivsberg, A. M., Wiig, K., Lind, G., Nødland, M., & Reichelt, K. L. (1990). Dietary intervention in autistic syndromes. *Brain Dysfunction* 3, 315-317.
- Konstantynowicz, J., Nguyen, T. V., Kaczmarek, M., Jamiolkowski, J., Piotrowska-Jastrzebska, J., & Seeman, E. (2007). Fractures during growth: potential role of a milk-free diet. *Osteoporosis International*, 18(12), 1601-1607.
- Kumar, P., O'Donoghue, P., Stenson, K., & Dawson, A. (1979). Reintroduction of gluten in adults and children with treated celiac disease. *Gut* 20(9), 743–749.
- Lange, K. W., Hauser, J., & Reissmann, A. (2015). Gluten-free and casein-free diets in the therapy of autism. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 18(6), 572–575.
- Le Menn-Tripodi, C., Vachaud, A., Defas, N., Malvy, J., Roux, S., & Bonnet-Brilhault, F. (2019). Sensory-psychomotor evaluation in autism: a new tool for functional diagnosis. *Encephale*, 45, 312-319.
- Lucarelli, S., Frediani, T., Zingoni, A. M., Ferruzzi, F., Giardini, O., Quintieri, F.,...Cardi, E. (1995). Food allergy and infantile autism. *Panminerva Medica*, 37(3), 137-141.
- Maestro, S., Casella, C., Milone, A., Muratori, F., & Palacio-Espasa, F., (1999). Study of the onset of autism through home movies. *Psychopathology*, 32(6), 292-300.
- Mahapatra, S., Vyshedsky, D., Martinez, S., Kannel, B., Braverman, J., Edelson, S. M., & Vyshedskiy, A. (2018). Autism Treatment Evaluation Checklist



- (ATEC) Norms: A "Growth Chart" for ATEC Score Changes as a Function of Age. *Children (Basel)*, 5(2), 25.
- Marí-Bauset, S., Zazpe, I., Mari-Sanchis, A., Llopis-González, A., & Morales-Suárez-Varela, M., (2014). Evidence of the gluten-free and casein-free diet in autism spectrum disorders: a systematic review. *Journal of Child Neurology*, 29(12), 1-10.
- Millward, C., Ferriter, M., Calver, S., & Connell-Jones, G., (2008). Gluten and casein free diets for autistic spectrum disorder. *Cochrane Database of Systematic Review*, 16(2), CD003498.
- Monti, G., Libanore, V., Marinaro, L., Lala, R., Miniero, R., & Savino, F. (2007). Multiple bone fracture in an 8 years old child with cow's milk allergy and inappropriate calcium supplementation. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51, 228-231.
- Mulloy, A., Lang, R., O'Reilly, M., Sigafos, J., Lancioni, G. I., & Rispoli, M., (2010). Gluten-free and casein-free diet in the treatment of autism spectrum disorders: a systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 4, 328-339.
- Navarro, F., Pearson, D. A., Fatheree, N., Mansour, R., Hashmi, S. S., & Rhoads, J. M., (2015). Are 'leaky gut' and behavior associated with gluten and dairy containing diet in children with autism spectrum disorders? *Nutritional Neuroscience*, 18(4), 177-185.
- Neumeyer, A. M., Gates, A., Ferrone, C., Lee, H., & Misra, M. (2013). Bone density in peripubertal boys with autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 43(7), 1623-1629.
- Nygaard, H. A. (2010). Pain in people with dementia and impaired verbal communication. *Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy*, 24(4), 414-426.
- Oneal, B. J., Reeb, R. N., Korte, J. R., & Butter, E. J. (2006). Assessment of home-based behavior modification programs for autistic children: reliability and validity of the behavioral summarized evaluation. *Journal of Prevention & Intervention in the Community*, 32(1-2), 25-39.
- Owen-Smith, A. A., Bent, S., Lynch, F. L., Coleman, K. J., Yau, V. M., Pearson, K. A.,... Croen, L. A. (2015). Prevalence and predictors of complementary and alternative medicine use in a large insured sample of children with autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 17, 40-51.
- Pedersen, L., Parlar, S., Kvist, K., Whiteley, P., & Shattock, P., (2013). Data mining the ScanBrit study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders: behavioural and psychometric measures of dietary response. *Nutritional Neuroscience*, 17(5), 207-213.

- Pennesi, C. M., & Klein, L. C. (2012). Effectiveness of the gluten-free, casein-free diet for children diagnosed with autism spectrum disorder: Based on parental report. *Nutritional Neuroscience*, 15(2), 85-91.
- Perrin, J. M., Coury, D. L., Hyman, S. L., Cole, L., Reynolds, A. M., Clemons, T., (2012). Complementary and alternative medicine use in a large pediatric autism sample. *Pediatrics*, 130(Suppl. 2), S77-S82.
- Piwowarczyk, .A., Horvath, A., Łukasik, J., Pisula, E., & Szajewska, H. (2018) Gluten- and casein-free diet and autism spectrum disorders in children: a systematic review. *European Journal of Nutrition*, 57(2), 433-440.
- Pusponegoro, H. D., Ismael, S., Firmansyah, A., Sastroasmoro, S., & Vandenplas, Y., (2015). Gluten and casein supplementation does not increase symptoms in children with autism spectrum disorder. *Acta Paediatrica*, 104(11), e500-5.
- Reichelt, K. L., & Knivsberg, A. M. (2003). Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutritional Neuroscience*, 6(1), 19-28.
- Reichelt, K. L., Knivsberg, A. M., Lind, G., & Nodland, M. (1991). Probable etiology and treatment of childhood autism. *Brain Dysfunktion*, 4(6), 308-319.
- Reichelt, K. L., Saelid, G., Lindback, T., & Boler, J. B. (1986). Childhood autism: a complex disorder. *Biological Psychiatry*, 21(13), 1279-1290.
- Reichelt, K. L., Tveiten, D., Knivsberg, A. M., & Bronstad, G., (2012). Peptide's role in autism with emphasis on exorphins. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 23, 18958.
- Reichow, B., Barton, E. E., Boyd, B. A., & Hume, K. (2014). Early Intensive Behavioral Intervention (EIBI) for Young Children with Autism Spectrum Disorders (ASD): A Systematic Review. *Campbell Systematic Reviews*, 9.
- Rimland, B., & Edelson, M. (1999). *Autism treatment evaluation checklist*. San Diego, CA: Autism Research Institute.
- Rubenstein, E., Schieve, L., Bradley, C., DiGuseppi, C., Moody, E., Thomas, K., & Daniels, J. (2018). The prevalence of gluten free diet use among preschool children with autism spectrum disorder. *Autism Research*, 11(1), 185–193.
- Sathe, N., Andrews JC, McPheeters ML, & Warren, Z. E. (2017). Nutritional and Dietary Interventions for Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Pediatrics*, 139(6), e20170346.
- Schopler, E., Reichler, R. J., DeVellis, R. F., & Daly, K., (1980). Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 10(1), 91-103.
- Seung, H. K., Rogalski, Y., Shankar, M., & Elder, J. (2007). The gluten- and casein-free diet and autism: communication outcomes from a preliminary

- double-blind clinical trial. *Journal of Medical Speech-Language Pathology*, 15(4), 337–339.
- Sokolov, O., Kost, N., Andreeva, O., Korneeva, E., Meshavkin, V., Tarakanova, Y.,...Zozulya, A. (2014). Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides* 56, 68–71.
- Trudeau, M. S., Madden, R. F., Parnell, J. A., Gibbard, W. B., & Shearer, J. (2019). Dietary and supplement-based complementary and alternative medicine use in pediatric autism spectrum disorder. *Nutrients*, 11.
- Tveiten, D., Finvold, A., Andersson, M., & Reichelt, K. L. (2014). Peptides and exorphins in the autism spectrum. *Open Journal of Psychiatry*, 4, 275–287.
- Wang, L., Angley, M. T., Gerber, J. P., Young, R. L., Abarno, D. V., McKinnon, R. A., & Sorich, M. J. (2009). Is urinary indolyl-3-acryloylglycine a biomarker for autism with gastrointestinal symptoms? *Biomarkers*, 14(8), 596-603.
- Whiteley, P. (2015). Nutritional management of (some) autism: a case for gluten- and casein-free diets? *Proceedings of the Nutrition Society*, 74(3), 202-207.
- Whiteley, P., Haracopos, D., Knivsberg, A. M., Reichelt, K. L., Parlar, S., Jacobsen, J.,...Shattock, P. (2010a). The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutritional Neuroscience*, 13(2), 87-100.
- Whiteley, P., Rodgers, J., Savery, D., Shattock, P., (1999). A gluten-free diet as an intervention for autism and associated spectrum disorders: preliminary findings. *Autism*, 3, 45-65.
- Whiteley, P., Shattock, P., Carr, K., Hooper, M., & Todd, L., (2010b). How could a gluten and casein-free diet ameliorate symptoms associated with autism spectrum conditions? *Autism Insights*, 2, 39-53.
- Whiteley, P., Shattock, P., Knivsberg, A. M., Seim, A., Reichelt, K. L., Todd, L.,... & Hooper, M. (2013). Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Frontiers in Human Neuroscience*, 6, 344.

**Table 1. Demographic and clinical variables according to the intervention groups**

Variables	Total (n=37)	Group A (n=20)	Group B (n= 17)	<i>p</i>
<b>Sex</b>				0.032 ( $\chi^2$ )
Males	20	13	16	
Females	17	7	1	
<b>Age (Mean <math>\pm</math> SD)</b>	8.9	9.1	8.8	0.83 (Student <i>t</i> test)
<b>Diagnosis ASD</b>				0.31 ( $\chi^2$ )
Autism (F84.0)	21	11	10	
Atypical autism (F84.1)	1	0	1	
Asperger syndrome (F84.5)	9	4	5	
PDD not otherwise specified (F84.9)	6	5	1	
<b>Scales at the beginning</b> (Mean $\pm$ SD)				
ATEC	63.3 $\pm$ 27.7	64.1 $\pm$ 28.7	62.3 $\pm$ 27.4	0.9 (Student <i>t</i> test)
ERC-III	26.0 $\pm$ 12.0	26.7 $\pm$ 13.3	25.0 $\pm$ 10.7	0.5 (Student <i>t</i> test)
ABC	43.5 $\pm$ 21.0	43.1 $\pm$ 22.4	44.0 $\pm$ 20.0	0.8 (Student <i>t</i> test)
<b>Psychotropic drug</b>				0.33 ( $\chi^2$ )
Yes	14	9	5	
No	23	11	12	

*ASD, Autism Spectrum Disorder; PDD, Pervasive Developmental Disorder; ATEC, Autism Treatment Evaluation Checklist; ERC-III, Behavioral Summarized Evaluation; ABC, Aberrant Behavior Checklist*

**Table 2. Scores (mean ± SD) on the Autism Treatment Evaluation Checklist (ATEC) scale based on groups and time points.**

Group	T0 (baseline)	T1 (6 months)	T2 (12 months)	<i>p</i> (Friedman test for related samples)	<i>p</i> (Wilcoxon test for paired samples)
A	64.1 ± 28.7 (n=20)	62.9 ± 28.9 (n=16)	63.8 ± 29.7 (n=14)	0.4	T0-T1: 0.4 T1-T2: 0.8
B	62.3 ± 27.4 (n=17)	54.9 ± 20.9 (n=15)	55.7 ± 26.7 (n=15)	0.3	T0-T1: 0.09 T0-T2: 0.3
All	ATEC before the GFCF diet: 62.1 ± 27.7 (n=33) ATEC after the GFCF diet: 59.1 ± 29.8 (n=29)			<i>d</i> =0.10	0.24

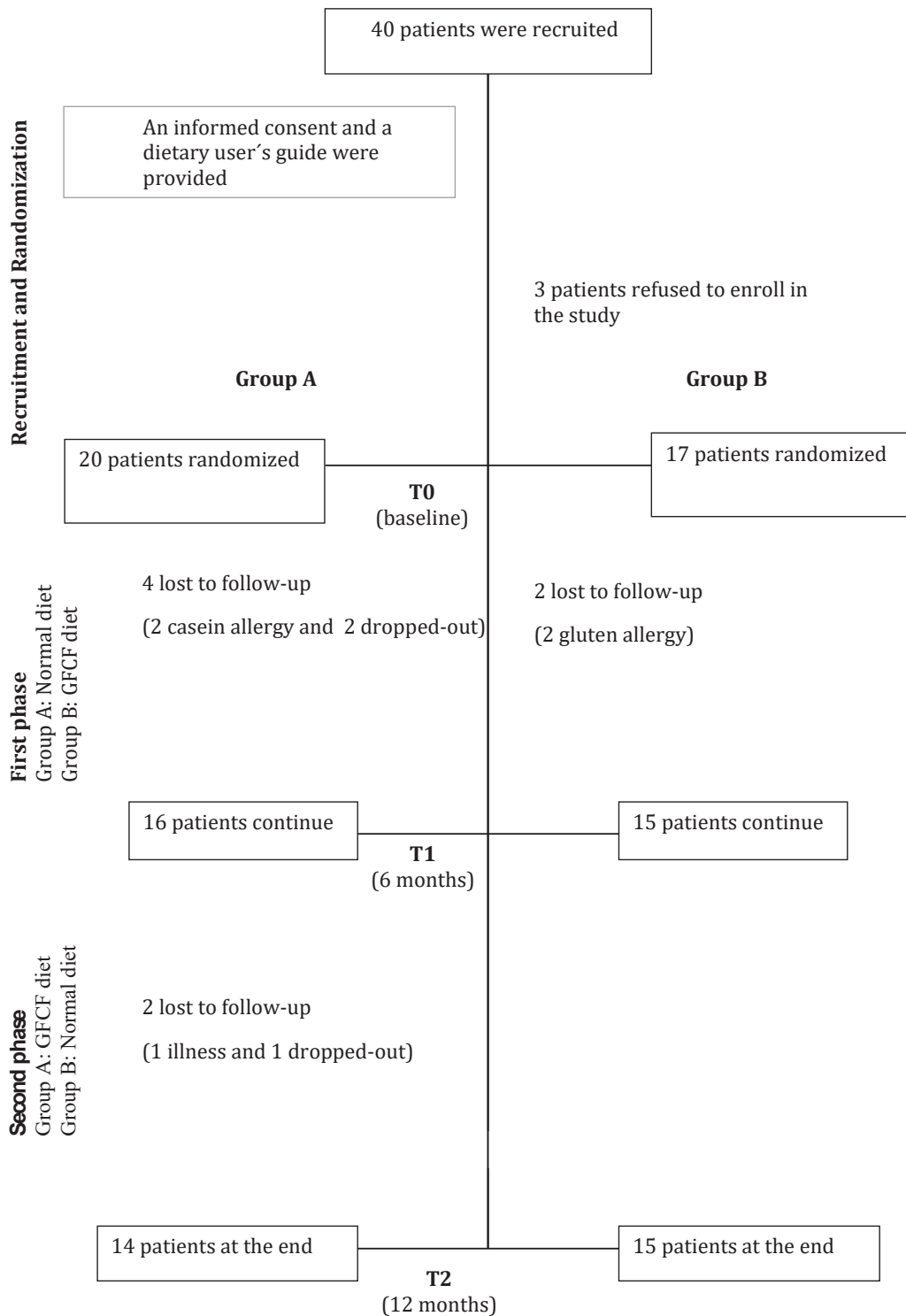
*ATEC, Autism Treatment Evaluation Checklist*

**Table 3. Concentration (mean ± SD) of beta-casomorphin in urine and scores of nutritional and anthropometric variables before and after the GFCF diet.**

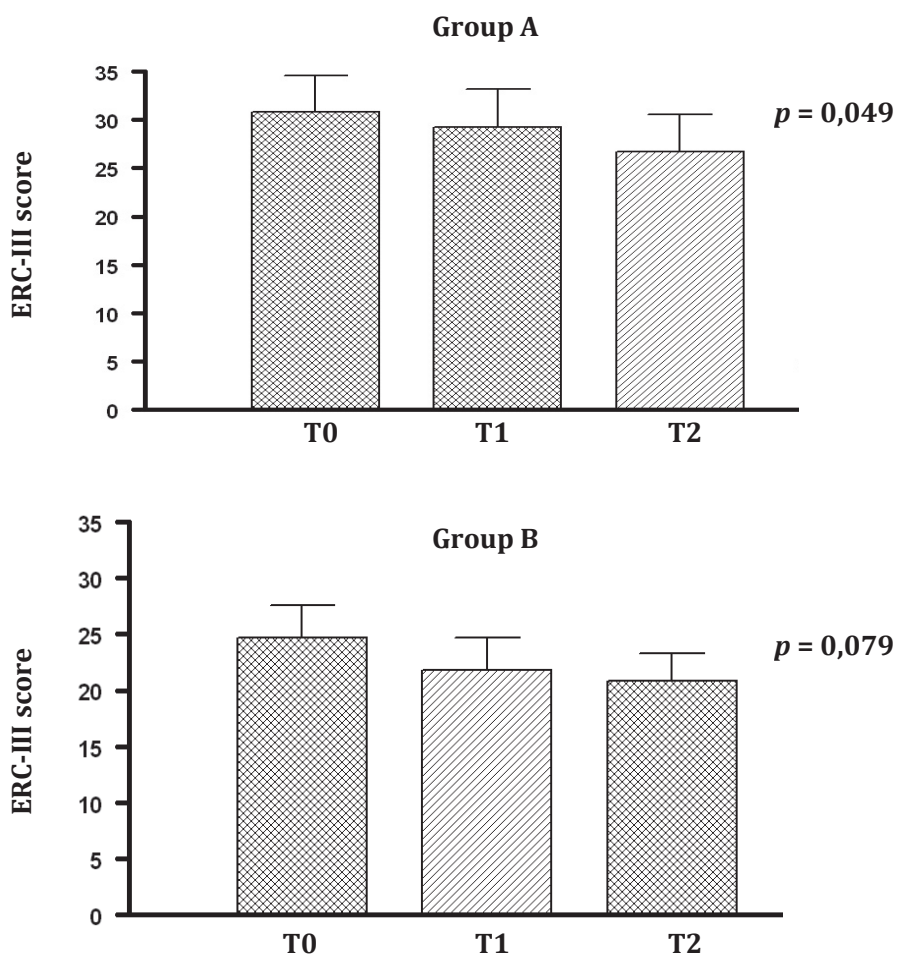
Variable	Before the GFCF diet	After the GFCF diet	Effect size (Cohen's <i>d</i> )	<i>p</i> (Mann-Whitney <i>U</i> test)	<i>p</i> (Wilcoxon matched pairs test)
<b>Beta-casomorphin (ng/ml)</b>	3.63 ± 4.4 (n=17)	2.30 ± 3.0 (n=10)	0.30	0.32	
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	18.4 ± 4.2 (n=34)	18.7 ± 4.3 (n=29)			0.92
<b>Calcium (mg/dl)</b>	9.9 ± 0.4 (n=25)	9.8 ± 0.5 (n=27)			0.47
<b>Vitamin D (ng/ml)</b>	26.3 ± 7.8 (n=24)	29 ± 10.6 (n=23)			0.20
<b>Ferritin (ng/ml)</b>	46.1 ± 33.6 (n=25)	48.7 ± 41.2 (n=26)			0.97
<b>Folic acid (ng/ml)</b>	10.7 ± 3.9 (n=25)	10.8 ± 5.2 (n=24)			0.95
<b>IGF-1 (ng/ml)</b>	233.3 ± 156.7 (n=24)	233.5 ± 161.8 (n=23)			0.36

*BMI, Body Mass Index; IGF-1, Insulin-like Growth Factor 1*

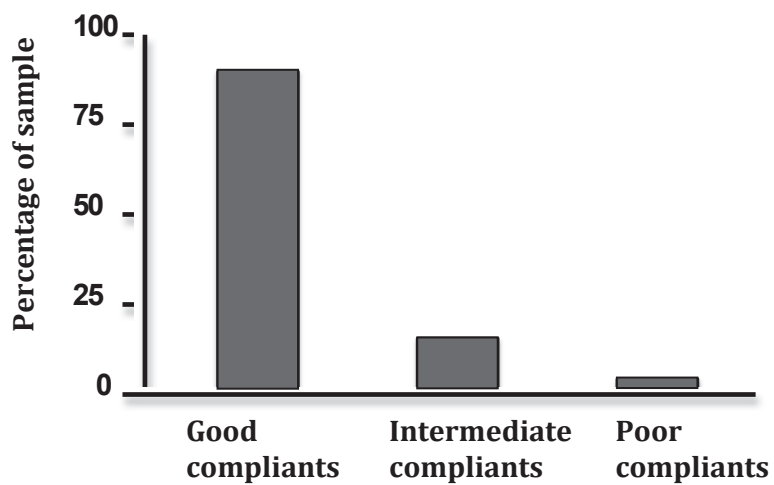
**Figure 1.** Flow chart of patients throughout the study.



**Figure 2.** Mean score ( $\pm$  SD) on the Behavioral Summarized Evaluation (ERC-III) scale at baseline (T0), at 6 months (T1) and at 12 months (T2) of 14 patients from group A (who started with normal diet) and another 15 patients from group B (who started with GFCF diet). The global statistical analysis within each group was performed using Friedman test for related samples. Regarding the two by two *post hoc* analysis, only T0 *versus* T2 in group A showed a statistically significant difference ( $p=0.036$ ).



**Figure 3. Distribution of the sample according to the level of compliance with the diet (measured using the 24-hour recall). Participants were classified into three groups: good compliants (80-100% compliance), intermediate compliants (50-79% compliance) and poor compliants (less than 50% compliance).**





# ANEXO 14: INTRODUCCIÓN DE LA TESIS PROPUESTA PARA PUBLICACIÓN DE ARTÍCULO DE REVISIÓN EN AUTISM RESEARCH (FACTOR DE IMPACTO: 4,532)

David G Amaral

7 October 2019 at 23:42

DA

Re: PERMISSION FOR SUBMIT A REVIEW ARTICLE

To: Pablo Glez Domenech

Hi Pablo,

Thanks for your interest in writing a review article.

I guess I am interested in what you think would be new in this review article that has not been written many times before. I note that there was no clinical benefit of the GF/CF diet in the paper that you published.

I think that there would be some new angle needed (eg. genetic approaches to determining who might benefit from a specific dietary modification) to make a Commentary or review article interesting to the Autism Research readership.

Best wishes,

David Amaral

On Oct 7, 2019, at 2:16 PM, Pablo Gonzalez Domenech <pgdomenech@me.com> wrote:

Dear Editor-in-Chief,

We are interested in preparing a review article on nutritional and dietary interventions in Autism Spectrum Disorders (ASD).

Over the past 20 years, articles published per year on nutrition and autism have increased exponentially.

Our research group (University of Granada, southern Spain) has developed in recent years two clinical trials on gluten-free and casein-free diets in ASD. The results of the first study have been published recently (Journal of Mental Health Research in Intellectual Disabilities; <https://doi.org/10.1080/19315864.2019.1654574>) and the second article has been submitted for publication (Journal of Autism and Developmental Disorders). The results of the two studies have been compiled in a doctoral thesis that I will defend publicly within a month.

As the first author of these articles and researcher in nutrition and autism, it would be a privilege for me to publish in your journal our review paper that examines the pathophysiological bases on which the use of these interventions is based and reviews the main studies on nutritional supplements and diets used in ASD.

Sincerely,

Pablo José González Domenech  
Médico Especialista en Psiquiatría

David G. Amaral, Ph.D.

UC Davis Distinguished Professor  
Beneto Foundation Endowed Chair  
The M.I.N.D. Institute, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Center for Neuroscience, and  
the California National Primate Research Center

Director, NIH Autism Center of Excellence

Director, Autism BrainNet  
[AutismBrainNet.org](http://AutismBrainNet.org)  
[TakesBrains.org](http://TakesBrains.org)  
[Watch Autism BrainNet webinar](http://Watch Autism BrainNet webinar)

Editor-in-Chief  
Autism Research

[Citation Index](#)

**Mailing Address:**  
University of California, Davis  
The M.I.N.D. Institute  
2825 50th Street  
Sacramento, CA 95817

Telephone (916) 703-0225  
Fax (916) 703-0287

Assistant: Gayna L. Guidici  
Phone, (916) 703-0237  
e-mail, [gguidici@UCDAVIS.EDU](mailto:gguidici@UCDAVIS.EDU)

For Autism BrainNet:  
Melissa Miller  
Telephone, 916-703-0275  
e-mail, [Melml@ucdavis.edu](mailto:Melml@ucdavis.edu)

<http://neuroscience.ucdavis.edu/faculty/amaral/>  
<http://www.ucdmc.ucdavis.edu/mindinstitute/>

Confidentiality Notice: The contents of this email are confidential, and intended only for the use of the individuals and/or entity named above. If the reader of this email is not the intended recipient, you are hereby notified that any dissemination, disclosure, copying, or distribution of the contents of this email message is strictly prohibited by law. If you receive this email in error, please immediately notify the sender by return email. Protected under Evidence Code 1157

