

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA



**TESIS DOCTORAL**

Contribución del microbioma al Trastorno del Espectro Autista:  
de la neurobiología a la intervención

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Isabel Serrano Tomás

DIRIGIDA POR

Rosa María del Campo Moreno  
Rafael María Cantón Moreno



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Programa de Doctorado en Microbiología y Parasitología



**TESIS DOCTORAL**

**Contribución del microbioma al Trastorno del Espectro Autista:  
de la neurobiología a la intervención**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

**MARÍA ISABEL SERRANO TOMÁS**

DIRECTORES

**DRA. ROSA MARÍA DEL CAMPO MORENO**

**DR. RAFAEL MARÍA CANTÓN MORENO**





*A Gael*

## AGRADECIMIENTOS

Una carrera de fondo. Cuatro años de aprendizaje en la sombra, de lecturas infinitas, de no comprender nada hasta que un día algo despierta en ti y las piezas van encajando.

En primer lugar, gracias a mis directores de Tesis, la Dra. del Campo y el Dr. Cantón, ha sido un orgullo, un auténtico placer y un privilegio poder contar con vosotros en una experiencia que jamás olvidaré.

Rosa, mi madre en la Ciencia. Desde el día que te conocí, me llenó tu entusiasmo y optimismo sin límites y supe que eras tú, que de tu mano saldrían grandes cosas. Un viaje de 10 minutos en la Renfe valió para crear este proyecto que ambas esperamos no termine aquí. Gracias por darme el impulso para continuar, por no dejar que abandonara cuando apenas me quedaban esperanzas. Gracias por tus palabras de aliento, palabras que mueven una energía arrolladora, por entusiasmarme, por creer en mí y dar alas a todos los pensamientos que rondaban mi cabeza. Te admiro profundamente como profesional y como persona, es un lujo tenerte cerca y poder aprender de ti.

Rafa, aún recuerdo la primera vez que hablamos. Mis pensamientos eran y seguirán siendo de máximo respeto y admiración. Gracias por la ilusión que transmites hacia lo que soy.

A mi Rizos. Facultativa, mentora, amiga y familia. Contigo comenzaron a derribarse los muros que había levantado llenos de inseguridad y miedo. Contigo me atreví a vencer esos fantasmas y dimos los primeros pasos que me llevarían hasta aquí. Me enseñaste muchas cosas, pero sobre todo a creer en mí, que soy capaz y que es posible. Gracias por aportar tu enfoque a esta tesis, por ver los detalles cuando ya estaba agotada y llegar donde yo no llegaría.

A mis chicas de investigación, a todas y cada una de ellas: Malkoa, Ainhize, Blanca, Mari, Marta, Carmen, Desi. Gracias por transmitir el espíritu de equipo, por acogerme, por ser mi sitio seguro. Qué bonito ha sido y es poder compartir con cada una de vosotras un momento especial, que llegó en el momento adecuado. Qué bonito es ir más allá de lo laboral y descubrir el mundo que hay en cada una de vosotras.

Mi Malko, los días comienzan a las 6 am con los podcast cargados de sentimiento. Gracias por ser luz en las sombras, por ser ese *punch* que revitaliza, por esa conexión que libera e impulsa. Gracias por tender la mano siempre y enraizar con sabiduría. Juntas creamos estelas.

Ainhize, iniciamos esta anda(dura) juntas, pero nuestra amistad ha trascendido. El apoyo y la seguridad que me das es indescriptible. Cuántas veces, sin ser consciente, has sido mi *Norte* y me has guiado por este camino.

Blanqui, agosto y tu vais de la mano. Siempre en el detalle, con estilo, música y dedicación. Gracias por abrirme un hueco y poder mostrarnos tal como somos, para ayudarnos desde el corazón.

Mari, eres risa, juventud, experiencia, resolución. Marta, siempre dices que fue en el último momento, pero nos encontramos en el preciso instante para poder aprender la una de la otra y vernos crecer. Carmen, añoro aquellas rutas cargadas de conversaciones llenas de fondo y sonrío al vernos progresar en nuestras vidas. Desi, como bien decías: “nunca será buen momento, así que ¡hazlo!”. ¡Cuánta razón tenías!

Por supuesto, a ti, Esther, la primera persona que conocí del Servicio, con esa sonrisa llena de fuerza. Tú me dijiste que estaba en el sitio adecuado y yo confié absolutamente en ti. No te equivocabas. Esther, fue breve, pero unas conversaciones bastaron para saber lo especial que eres. Solo me queda decirte: ¡lo hemos conseguido!

Gracias a mis compañeros, facultativos y residentes, del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, que de una forma u otra habéis contribuido a que llegue hasta aquí, con cada palabra, detalle o conversación que dejó huella y hoy se hace realidad. Gracias a mis compañeras del HCD “Gómez Ulla”, que me habéis acompañado en la recta final y me habéis animado en el día a día.

Gracias a la Dra. Alicia Mansilla y al Dr. Sergio Casas, quienes me introdujeron en el maravilloso mundo de la neurociencia. Aprender de vuestras mentes privilegiadas ha sido un verdadero lujo. Alicia, gracias por esa conexión cuando más lo necesitaba. Sergio, tienes una energía que desprende inteligencia, comprensión y sabiduría.

Gracias a mis chilenos, en especial a Sheila, Andrés y Fran, con vosotros comprendí el verdadero significado de la palabra *hospitalidad*. Sois sinónimo de casa. Gracias por darlo absolutamente todo sin esperar nada a cambio, con el objetivo de que el viaje fuese una experiencia inolvidable. Lo conseguisteis.

No podrían faltar mis profesoras de la Facultad, la Dra. Sagrario Martín-Aragón y la Dra. Paloma Bermejo. Con vosotras creció la semilla de la investigación y con ella, la medicina personalizada. En vosotras vi el ejemplo de lo que me gustaría llegar a ser. Se puede enseñar y exigir bien, se puede tender una mano amiga y establecer límites. Me encanta seguir contactando cada año con vosotras.

Gracias a mis amigas, las Martas, Ana, Alejandra y Bea que mantienen este hilo y hacen que todo lo demás esté bien para que pueda continuar con lo que realmente importa. Es impresionante ver cómo pasa el tiempo, nos hacemos mayores, progresamos y disfrutamos juntas.

A María Cabrera, por la magia tan bonita que nos une. Siempre de la mano en los momentos más felices y también los más duros. A Marga, que nos hemos visto crecer en lo personal y lo laboral.

Gracias a mi familia, a mis padres, por inculcarme los valores, la educación, el saber estar, la constancia y la disciplina. La *neuroplasticidad* comenzó con vosotros cuando cada noche, antes de ir a dormir, repetíamos las frases de autoafirmación positiva. Mamá, tu fuerza leonina no me permitió abandonar, me lanzaste a la *carrera de fondo* y no aceptaste un *no* por respuesta. Gracias a mi hermana por ser red de apoyo, comprender y sostener, sostener y sostener. Nos admiramos tanto como nos queremos. Eres mi persona.

Y, por último, a Guille, mi alma compañera y viajera. Gracias por mostrar interés, respeto y admiración por mi trabajo. Por ver la inteligencia en mi visión miope. Por recargar mi energía en los momentos en los que 'ya no quiero pensar más'. Juntos hemos creado lo más maravilloso de nuestra vida, a nuestro hijo Gael, el verdadero artífice de estas páginas. Gracias por iluminar el camino y hacerlo más fácil, por desbloquear los miedos y hacer que esto sea posible. Te queremos.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	3
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	14
I. EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA.....	14
1. Definición.....	14
2. Historia y descubrimiento.....	14
3. Sistemas de clasificación diagnósticas: DSM-5 y CIE-11.....	17
4. Epidemiología global del TEA.....	21
5. Factores de riesgo: genéticos y ambientales.....	23
6. Tratamiento del TEA.....	27
II. EL MICROBIOMA INTESTINAL HUMANO.....	34
1. Historia y relación con la salud y la enfermedad.....	34
2. El eje microbiota-intestino-cerebro: mecanismos de comunicación.....	38
3. Metabolitos microbianos: producción y funciones.....	47
4. <i>p</i> -cresol.....	53
5. Microbiota y neurodesarrollo.....	68
6. Alteraciones de la composición microbiana en TEA.....	75
<b>HIPÓTESIS GENERAL</b> .....	86
<b>CAPÍTULO I: Efectos neurobiológicos del microbioma autista: una aproximación <i>in vivo</i> en <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	89
I. ANTECEDENTES.....	89
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	89
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	90
1. Diseño del estudio.....	90
2. Diseño experimental en <i>D. melanogaster</i> .....	90
3. Procesamiento de las muestras fecales.....	91
4. Suplementación con microbiota de sujetos TEA.....	92
5. Almacenamiento y genética de <i>D. melanogaster</i> .....	92

6. Histología e inmunofluorescencia .....	92
7. Cuantificación .....	92
8. Ensayos de viabilidad.....	93
9. Análisis estadístico.....	93
IV. RESULTADOS.....	94
1. Colonización inicial .....	94
2. Aislamiento de bacterias y primera suplementación experimental.....	96
3. Suplementación experimental y comparación con grupos experimentales .....	97
4. Efecto funcional sobre el sistema nervioso periférico .....	99
V. DISCUSIÓN .....	99
<b>CAPÍTULO II. Reconocimiento del metabolito microbiano <i>p</i>-cresol en el Trastorno de Espectro Autista: revisión sistemática y metaanálisis.....</b>	<b>106</b>
I. ANTECEDENTES.....	106
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	107
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	108
1. Diseño estudio y estrategia de búsqueda .....	108
2. Criterios de elegibilidad .....	108
3. Extracción de datos y evaluación de la calidad de los estudios .....	109
4. Metaanálisis y evaluación de la heterogeneidad .....	111
IV. RESULTADOS.....	111
1. Características de los estudios incluidos .....	111
2. Niveles elevados de <i>p</i> -cresol en orina .....	114
3. Niveles elevados de <i>p</i> -cresol en heces.....	116
V. DISCUSIÓN .....	117
<b>CAPÍTULO III: Modulación del microbioma intestinal con psicobióticos .....</b>	<b>122</b>
I. ANTECEDENTES.....	122
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	123
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	123
1. Diseño del estudio .....	123
2. Protocolo de intervención probiótico .....	124
3. Procesamiento de las muestras y secuenciación .....	125
4. Análisis bioinformático y estadístico .....	125

IV. RESULTADOS.....	126
V. DISCUSIÓN.....	134
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>140</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>144</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>162</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

### 3

**3-HBA:** Ácido 3-hidroxibenzoico

**3-HPPA:** Ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico

**3,4-diHBA:** Ácido 3,4-dihidroxibenzoico

### 4

**4-HPA:** Ácido 4-hidroxifenilacético

**4-HPPA:** Ácido 4-hidroxifenilpropiónico

### A

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNr:** ADN ribosomal

**AGCC:** Ácidos grasos de cadena corta

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ASD:** Autism Spectrum Disorder

**AXIS:** *Appraisal tool for Cross-Sectional Studies*

### C

**CIE:** *Clasificación Internacional de Enfermedades*

### D

**DAMPs:** Patrones moleculares asociados a daño celular

**DSM:** *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales*

### F

**FMR1:** *Fragile X Mental Retardation gene 1*

### G

**GF:** Libres de gérmenes

### H

**HHA:** Ácido 3-hidroxihipúrico

**HPA:** Ácido 3-hidroxifenilacético

**HPHPA:** Ácido 3-(3-hidroxifenil)-3-hidroxiopropiónico

## K

**KEAP1:** Proteína asociada a Kelch ECH 1

**KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

**KOs:** KEGG Orthologs

## L

**LFC:** Cambio log<sub>2</sub>

## M

**MIC:** Microbiota-intestino-cerebro

## N

**NRF2:** Factor de transcripción nuclear eritroide

## O

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OTU:** Unidades taxonómicas operativas

## P

**PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos

**PRISMA:** *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*

## S

**SNC:** Sistema nervioso central

## T

**TEA:** Trastorno del Espectro Autista

**TLR:** Receptores *Toll-like*

**TMA:** Trimetilamina

**TMAO:** N-óxido de trimetilamina

**TPM:** Transcriptos por millón

## U

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

**Figura 1.** Prevalencia global del TEA.

**Figura 2.** Eje microbiota-intestino-cerebro.

**Figura 3.** Sistema nervioso entérico

**Figura 4.** Síntesis de *p*-cresol y *p*-cresol sulfato a partir de la tirosina y/o fenilalanina.

**Figura 5.** Efectos fisiopatológicos del *p*-cresol y *p*-cresol sulfato.

**Figura 6.** Inhibición de la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa por el *p*-cresol y los compuestos intermediarios de su síntesis.

**Figura 7.** Microbiota y neurodesarrollo a lo largo de la vida.

**Figura 8.** Imagen de una motoneurona de la mosca de la fruta en el microscopio confocal.

**Figura 9.** Efecto del control vs. microbiota TEA en el número de sinapsis.

**Figura 10.** Efecto del tipo de microbiota adquirida sobre la actividad locomotora.

**Figura 11.** Efecto de la administración de distintas especies de *Clostridium* sobre el número de sinapsis en el grupo control.

**Figura 12.** Efecto de la administración de microbiota intestinal control frente a donante sano, paciente con TEA y *P. bifementans* sobre el número de sinapsis.

**Figura 13.** Diagrama de flujo PRISMA.

**Figura 14.** *Forest-plot* que compara la concentración de *p*-cresol en heces y orina, y de *p*-cresol sulfato en orina de sujetos con TEA y controles sanos.

**Figura 15.** Comparación de abundancias relativas de la expresión de los distintos órdenes taxonómicos bacterianos comparando la muestra basal y tras tratamiento con el psicobiótico.

**Figura 16.** Actividad diferencial de las rutas metabólicas bacterianas.

**Figura 17.** Actividad diferencial de las vías metabólicas bacterianas (metabolismo secundario también incluido).

**Tabla 1.** Criterios de diagnóstico para TEA.

**Tabla 2.** Clasificación del TEA (CIE-11: 6A02).

**Tabla 3.** Características de los estudios incluidos en el metaanálisis.

**Tabla 4.** KEGGs mayoritarios en la muestra de heces basal y sus funciones.

**Tabla 5.** KEGGs mayoritarios en la muestra recogida tras el tratamiento psicobiótico y sus funciones.





# Resumen

**RESUMEN**

El trastorno del espectro autista (TEA) es un conjunto de patologías que se caracterizan por alteraciones en la comunicación social y patrones de comportamiento restringido o repetitivo, con una etiología multifactorial que aún no ha sido completamente descifrada. En los últimos años, ha cobrado relevancia el papel del microbioma intestinal en la modulación de funciones neurobiológicas, proponiéndose como un actor clave en el eje intestino-cerebro y su posible implicación en los mecanismos subyacentes al TEA. Esta tesis doctoral aborda de manera integral la relación entre el microbioma intestinal y el TEA, combinando modelos experimentales, estudios meta-analíticos y enfoques terapéuticos emergentes.

En el **capítulo 1**, se realizó un estudio prospectivo para analizar el efecto de la microbiota intestinal de niños con TEA sobre el sistema nervioso central (SNC) de *Drosophila melanogaster*, en comparación con la microbiota de sujetos neurotípicos. La exposición de las larvas a microbiota fecal de sujetos con TEA provocó un aumento considerable en el número de sinapsis en la unión neuromuscular. Sin embargo, no se detectaron alteraciones funcionales evidentes en términos de locomoción en moscas adultas, lo que sugiere que el número de sinapsis no necesariamente implica una función neuronal adecuada.

En el **capítulo 2**, se realizó una revisión sistemática y un metaanálisis sobre el metabolito microbiano *para*-cresol en muestras biológicas, identificado como un biomarcador potencialmente neurotóxico en individuos con TEA. Se seleccionaron 15 artículos que cumplieron los criterios de inclusión para el metaanálisis. Los resultados mostraron una asociación significativa entre niveles elevados de *para*-cresol en orina y la presencia de síntomas TEA, apoyando su implicación en la fisiopatología del trastorno. En las heces, el metaanálisis no fue concluyente; sin embargo, los niveles de *p*-cresol fueron consistentemente más altos en el grupo con TEA, aunque sin alcanzar significancia estadística.

Finalmente, en el **capítulo 3**, se ha realizado un estudio piloto de un caso clínico pediátrico para explorar la modulación del microbioma intestinal mediante el uso de psicobióticos. Para ello se evaluó el perfil del microbioma intestinal, así como la

producción de metabolitos microbianos y neurotransmisores, antes y después de la administración de los psicobióticos. Los análisis metatranscriptómicos revelaron un aumento significativo en la expresión de genes asociados al metabolismo del butirato asociado a una mayor abundancia de especies como *Faecalibacterium prausnitzii* y *Bifidobacterium* spp. Durante la intervención, se observó una mejora clínica significativa en los síntomas gastrointestinales y centrales del sujeto.

En conjunto, esta tesis contribuye al entendimiento de los mecanismos por los cuales el microbioma intestinal puede influir en la neurobiología del TEA, y resalta el valor de integrar modelos animales, estudios clínicos y aproximaciones terapéuticas en el estudio del eje intestino-cerebro. Los hallazgos aquí presentados abren nuevas perspectivas para la identificación de biomarcadores microbianos y el desarrollo de intervenciones basadas en la modulación del ecosistema intestinal.

## ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a group of conditions characterized by impairments in social communication and restricted or repetitive patterns of behavior, with a multifactorial etiology that has not yet been fully elucidated. In recent years, the role of the gut microbiome in modulating neurobiological functions has gained prominence, proposing it as a key player in the gut-brain axis and its potential involvement in the underlying mechanisms of ASD. This doctoral thesis comprehensively addresses the relationship between the gut microbiome and ASD, combining experimental models, meta-analyses, and emerging therapeutic approaches.

In **Chapter 1**, a prospective study was conducted to analyze the effect of the gut microbiota from children with ASD on the central nervous system of *Drosophila melanogaster*, compared to the microbiota of neurotypical subjects. Larval exposure to fecal microbiota from individuals with ASD resulted in a significant increase in the number of synapses at the neuromuscular junction. However, no evident functional alterations in locomotion were observed in adult flies, suggesting that an increased number of synapses does not necessarily correlate with proper neuronal function.

In **Chapter 2**, a systematic review and meta-analysis were performed on the microbial metabolite p-cresol in biological samples, identified as a potentially neurotoxic biomarker in individuals with ASD. Fifteen articles meeting the inclusion criteria were selected for the meta-analysis. The results demonstrated a significant association between elevated urinary p-cresol levels and the presence of ASD symptoms, supporting its role in the disorder's pathophysiology. In fecal samples, the meta-analysis was inconclusive; however, p-cresol levels were consistently higher in the ASD group, though not reaching statistical significance.

Finally, in **Chapter 3**, a pilot case study of a pediatric patient was conducted to explore gut microbiome modulation via psychobiotics. The gut microbiota profile, along with microbial metabolite and neurotransmitter production, was assessed before and after psychobiotic administration. Metatranscriptomic analyses revealed a significant increase in the expression of genes associated with butyrate metabolism, coinciding with a higher abundance of species such as *Faecalibacterium prausnitzii* and

*Bifidobacterium* spp. During the intervention, significant clinical improvements were observed in both gastrointestinal and central symptoms of the patient.

Overall, this thesis advances the understanding of the mechanisms by which the gut microbiome may influence the neurobiology of ASD and highlights the value of integrating animal models, clinical studies, and therapeutic approaches in the study of the gut-brain axis. The findings presented here open new perspectives for the identification of microbial biomarkers and the development of interventions based on modulating the intestinal ecosystem.





# Introducción

## INTRODUCCIÓN

### I. EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

#### 1. DEFINICIÓN

El TEA comprende un conjunto de condiciones del neurodesarrollo que se manifiestan típicamente durante los primeros tres años de vida. Se caracteriza por alteraciones en la intersubjetividad y la cognición social, con impactos en el lenguaje y las funciones ejecutivas. Asimismo, las personas con TEA suelen presentar una atención sostenida y selectiva, así como dificultades en el aprendizaje y la integración sensorial (1).

Actualmente, no disponemos de marcadores biológicos validados para el reconocimiento del TEA, y el diagnóstico es fundamentalmente clínico y requiere colaboración multidisciplinar, ya que muchos de los síntomas tienden a solaparse con otras patologías como los trastornos de déficit de atención con/sin hiperactividad, con trastornos obsesivo-compulsivos, con discapacidad intelectual, así como otros trastornos de personalidad (1). Es prioritario disponer de sistemas de clasificación eficaces y con validación científica, así como de instrumentos de evaluación específicos para lograr un diagnóstico certero y precoz del TEA. Éstos, además deben estar estandarizados, validados científicamente y con procedimientos específicos para su aplicación que eviten las diferencias debidas al evaluador.

#### 2. HISTORIA Y DESCUBRIMIENTO

El concepto de TEA ha evolucionado desde sus primeras referencias históricas hasta la actualidad, impulsado por cambios en las percepciones sociales, los criterios diagnósticos y los métodos de enseñanza. Las primeras referencias datan de finales del siglo XIX, cuando **John Langdon Down**, conocido por su descripción del Síndrome de Down, fue uno de los primeros médicos en señalar que algunos niños presentaban dificultades significativas en la comunicación social y mostraban aislamiento emocional, características distintas a la discapacidad intelectual clásica. La expresión *Dementia praecocissima*, atribuida al psiquiatra italiano **Sante De Sanctis**, fue utilizada para describir casos de demencia en edades tempranas. En esta misma línea, observó y documentó casos de niños con retrasos mentales atípicos, acompañados de trastornos

afectivos y conductuales que no encajaban en las clasificaciones convencionales actuales (2). Posteriormente, **Theodor Heller** acuñó el término demencia infantil para describir un cuadro regresivo en niños previamente desarrollados, caracterizado por la pérdida de capacidades cognitivas, lingüísticas y sociales (3). Aunque inicialmente asociado a formas tempranas de esquizofrenia, este cuadro prefiguró lo que más tarde sería conocido como el Trastorno Desintegrativo Infantil, actualmente integrado en el TEA (1).

En 1911, **Eugen Bleuler** introdujo por primera vez el término autismo (del griego *autos*, uno mismo, e *ismos*, modo de ser), como un síntoma de algunos casos de esquizofrenia severa. Lo definió como un retraimiento hacia el mundo interior, con desconexión de la realidad externa. Posteriormente, su discípulo **Carl Gustav Jung** amplió el enfoque psicoanalítico, introduciendo los conceptos de extroversión e introversión. Desde esta perspectiva, una persona con autismo sería alguien con una introversión severa, que disfruta de la soledad y de su mundo interno, en el contexto de la esquizofrenia (4). No sería hasta 1925 cuando se definió de manera más completa el concepto actual de autismo, gracias a las contribuciones de la psiquiatra infantil soviética **Grunya Sukhareva**. A pesar de la precisión y modernidad de sus observaciones, que anticiparon muchos criterios diagnósticos actuales, sus trabajos pasaron desapercibidos hasta hace poco, momento en el que se reconoce su papel fundamental (5).

Una década después, el conocimiento sobre el autismo emergió con los trabajos de **Leo Kanner** en Estados Unidos (EE.UU.) (1943) y **Hans Asperger** en Austria (1944). Con la publicación de su primer artículo, Kanner delimitó el trastorno y le asignó la denominación de autismo infantil precoz. Destacaba como características principales la obsesión, los déficits en la interacción social y una cierta uniformidad en el estilo de vida del niño (6). Un año después, de forma independiente, Hans Asperger publicó observaciones similares, aunque sus trabajos permanecieron en el olvido durante años, probablemente por el idioma en que estaban escritos. No fue hasta los años 80 que estos estudios fueron ampliamente reconocidos, gracias a las traducciones realizadas por **Lorna Wing** (6).

Por otra parte, las teorías del psicoanalista **Bruno Bettelheim**, que atribuían el autismo a la crianza fría y ausente de las madres, las llamadas “madres nevera”, fueron desacreditadas posteriormente. Estas ideas, apoyadas inicialmente por Leo Kanner, causaron un impacto devastador en muchas familias (6).

En la década de 1960, las investigaciones comenzaron a adoptar enfoques basados en la neurociencia y la psicología del desarrollo. Entre los destacados en este período se encuentra **Bernard Rimland**, un psicólogo estadounidense que propuso que el autismo era un trastorno del desarrollo cerebral. Defendió la importancia de investigar causas de origen biológico y de fundamentar los tratamientos en evidencia científica sólida (3).

Con el fin de unificar y estandarizar los criterios diagnósticos en salud mental, en los años 50 se crearon dos principales clasificaciones internacionales: el *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales* (DSM, en inglés), publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría, y la *Clasificación Internacional de Enfermedades* (CIE o ICD, en inglés), de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Mientras las primeras ediciones del DSM mantenían una orientación influida por el psicoanálisis, la tercera edición publicada en 1980 (DSM-III) supuso un cambio hacia una clasificación más empírica, descriptiva y basada en criterios observables. En esta versión, se introdujo el término *Trastorno Autista Infantil*, que se incluyó dentro de los *Trastornos Generalizados del Desarrollo* (6).

Por otra parte, en ese mismo período, las investigadoras **Lorna Wing** y **Judith Gould** propusieron el concepto de *espectro autista*, con el objetivo de agrupar las distintas manifestaciones clínicas del autismo. Establecieron tres áreas principales de afectación: la interacción social, la comunicación y flexibilidad del pensamiento y del comportamiento. Sus estudios epidemiológicos demostraron que la prevalencia del autismo era mucho mayor de lo que se pensaba, lo que motivó cambios importantes en los criterios diagnósticos y en las estrategias de intervención (6).

Las sucesivas revisiones del DSM ajustaron los criterios diagnósticos hasta consolidar todas las subcategorías en un único diagnóstico llamado *Trastorno del Espectro Autista* en la quinta edición del manual, conocida como DSM-5 (7).

Finalmente, cabe destacar la contribución de **Uta Frith** a principios del siglo XXI. Esta psicóloga y especialista en desarrollo cognitivo propuso teorías innovadoras sobre las bases cognitivas del autismo y ha tenido un impacto importante en el desarrollo de intervenciones y estrategias educativas adaptadas a las necesidades de las personas con TEA (8).

---

### 3. SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN DIAGNÓSTICAS: DSM-5 Y CIE-11

#### **DSM-5**

La quinta edición del DSM (DSM-5) publicada en 2013, unifica en la categoría de TEA a varias condiciones previamente consideradas por separado: el Trastorno Autista, el Trastorno de Asperger, el Trastorno Desintegrativo de la Infancia y el Trastorno Generalizado del Desarrollo sin especificar. Esta actualización proporciona criterios estandarizados que facilitan el diagnóstico preciso del autismo (Tabla 1) y aclara aspectos tanto prácticos como conceptuales importantes (7).

El diagnóstico del TEA se basa en déficits en las habilidades sociales y en la comunicación, además de intereses fijos y comportamientos repetitivos. Un cambio relevante en esta versión fue la inclusión de las alteraciones sensoriales, que pueden manifestarse como hiperreactividad o hiporreactividad a estímulos sensoriales. En conjunto, el TEA es considerado un trastorno del desarrollo neurológico presente desde la infancia o la niñez temprana. Sin embargo, en algunos casos, su detección puede retrasarse hasta edades posteriores, debido a la menor demanda social en los primeros años y al apoyo que reciben los cuidadores y la familia en esa etapa (7).

**Tabla 1. Criterios de diagnóstico para TEA.** Adaptada de DSM-5 (7).

<b>Categoría</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ejemplos (no exhaustivos)</b>
<b>A. Déficits persistentes en la comunicación e interacción social en múltiples contextos</b>	Manifestados actualmente o a través del historial. Deben cumplirse los tres puntos siguientes:	
A1	Déficits en la reciprocidad socioemocional	Desde acercamiento social anormal y fallo en la conversación, hasta ausencia de interés en compartir emociones o responder a interacciones sociales
A2	Déficits en conductas comunicativas no verbales	Problemas con el contacto visual, lenguaje corporal, uso de gestos o falta total de comunicación no verbal
A3	Déficits en desarrollo, mantenimiento y comprensión de relaciones	Dificultades para ajustar el comportamiento social, compartir juegos imaginativos o mostrar interés por otros
<b>B. Patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades</b>	Manifestados actualmente o a través del historial. Deben cumplirse al menos dos de los siguientes:	
B1	Comportamientos estereotipados o repetitivos	Movimientos, uso de objetos, ecolalia, frases idiosincráticas
B2	Insistencia en la invariabilidad	Malestar ante cambios, rituales, necesidad de rutinas estrictas
B3	Intereses muy restringidos o fijación intensa	Preocupación por objetos inusuales o intereses excesivamente circunscritos
B4	Hiper o hiporreactividad a estímulos sensoriales	Indiferencia al dolor/temperatura, respuesta a sonidos/texturas, fascinación por luces o movimiento

En las últimas décadas y con la transición de DSM-IV-TR a DSM-5, el diagnóstico TEA ha experimentado un aumento considerable (9). Este incremento puede atribuirse a diversos factores, como una mayor conciencia social, la ampliación de los criterios diagnósticos, y la mejora en los métodos de detección temprana. Además, la inclusión del autismo dentro del espectro y la mayor disponibilidad de recursos diagnósticos han contribuido a identificar más casos que en el pasado permanecían sin diagnóstico o subdiagnosticados. Este fenómeno ha llevado a que la prevalencia comunicada sea mucho mayor de lo que se había estimado anteriormente, impactando en la planificación de servicios y en la comprensión del trastorno (6).

El diagnóstico del TEA se basa principalmente en entrevistas a familiares y en pruebas de observación directa utilizando instrumentos estandarizados. En primer lugar, se realiza una entrevista de cribado, dirigida a padres y cuidadores de los niños, con el objetivo de detectar signos tempranos de riesgo de TEA a partir de los 18 meses de edad. Una herramienta especialmente útil en la detección temprana es el *Cuestionario M-CHAT Revisado* que consta de 20 preguntas relacionadas con el comportamiento social, la comunicación y los intereses restringidos o repetitivos ([www.mchatscreen.com](http://www.mchatscreen.com)). Si los resultados indican posible riesgo, el niño es derivado a un especialista en neurodesarrollo para realizar una evaluación más exhaustiva (7).

Esta evaluación incluye la recogida de información sobre el embarazo, el parto, el período postnatal y el desarrollo psicomotor, comunicativo y afectivo durante los primeros años de vida. Además, se buscan antecedentes familiares y personales de problemas médicos o psiquiátricos (10). Una de las herramientas más valoradas y utilizadas tanto en investigación como en clínica es la *Entrevista para el Diagnóstico del Autismo Revisada*. Como complemento al diagnóstico, también se realiza una exploración y valoración sistemática del niño, junto con pruebas específicas que concentran su análisis en las áreas afectadas. Entre estas, la más empleada es la *Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic*, considerada un instrumento de referencia en protocolos de investigación, ya que ofrece puntuaciones de corte para el diagnóstico de TEA (1).

La evaluación integral concluye con una estimación del desarrollo cognitivo mediante las pruebas estandarizadas dirigidas a la población general, con versiones para todas las edades. Algunas de las más utilizadas son “las Escalas de Inteligencia de Wechsler”, “las Escalas McCarthy de Aptitudes y Psicomotricidad para Niños” o “la Escala Manipulativa Internacional de Leiter-R, revisada y ampliada”. La elección se basa en la edad cronológica y de la presencia o no de lenguaje verbal funcional (7).

### CIE-11

Del mismo modo, la OMS publicó la undécima edición de la CIE (CIE-11), que entró en vigor en 2022 y recoge el diagnóstico de TEA de forma muy similar a la clasificación norteamericana. Categoriza el TEA en los trastornos del neurodesarrollo, incluye las mismas características y agrupa las manifestaciones clínicas en dos áreas principales como el DSM-5. Sin embargo, la CIE-11 ofrece una subdivisión de la gravedad de los trastornos del espectro distinta a la clasificación descriptiva propuesta por el manual americano (Tabla 2). A diferencia del DSM-5, la CIE-11 no incluye hiper o hiporreactividad a los estímulos sensoriales, ni tampoco incluye intereses inusuales en los aspectos sensoriales del entorno (11).

**Tabla 2. Clasificación del TEA (CIE-11: 6A02) (11).**

Código	Trastorno del desarrollo intelectual	Deficiencia del lenguaje funcional
6A02.0	Sin trastorno	Sin trastorno o muy leve
6A02.1	Con trastorno	Sin trastorno o muy leve
6A02.2	Sin trastorno	Con trastorno
6A02.3	Con trastorno	Con trastorno
6A02.4	Sin trastorno	Ausencia de lenguaje funcional
6A02.5	Con trastorno	Ausencia de lenguaje funcional

Nota: Existen dos categorías adicionales, no descritas (6A02.Y / 6A02.Z): para “otro” trastorno especificado del espectro autista; y para un trastorno “no específico” del espectro autista.

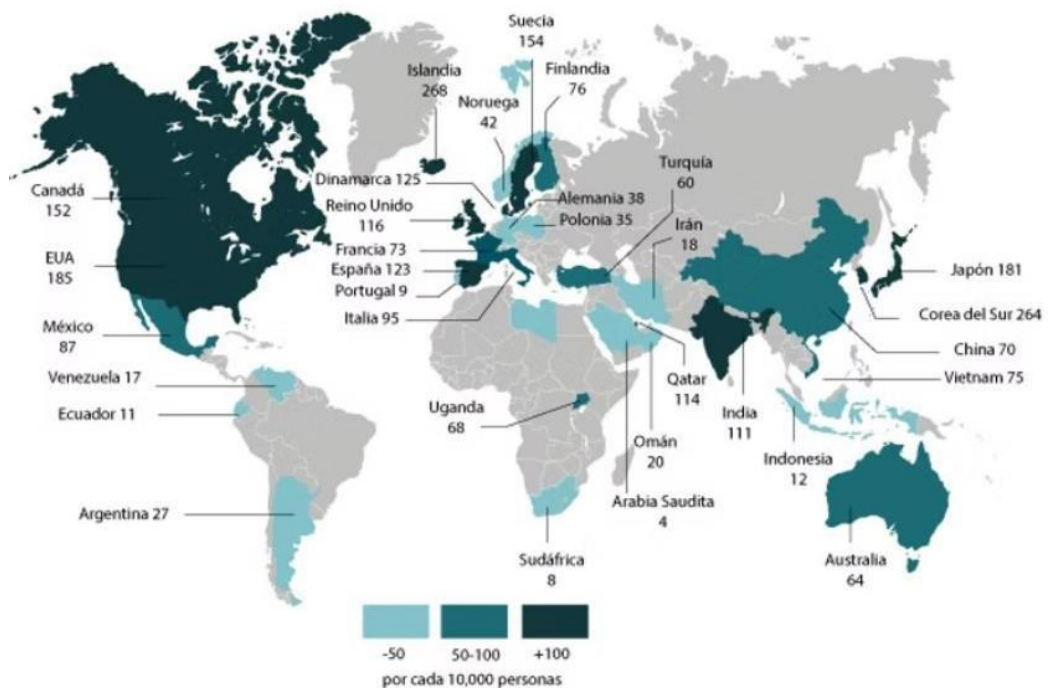
### Trastornos asociados al autismo

La práctica clínica pone de manifiesto las dificultades que existen en el diagnóstico diferencial del TEA, especialmente en edades tempranas, respecto a otros trastornos del

neurodesarrollo como el trastorno de déficit de atención con/sin hiperactividad o la discapacidad intelectual. Esta complejidad diagnóstica se acentúa aún más cuando se plantea la posibilidad de un trastorno específico del lenguaje, debido a la superposición de síntomas entre estas condiciones (7,11).

#### 4. EPIDEMIOLOGÍA GLOBAL DEL TEA

La prevalencia global del TEA ha experimentado un aumento en las últimas décadas, que puede ser el resultado de una mayor concienciación social, así como a los avances en los criterios y métodos diagnósticos. Con el objetivo de actualizar las estimaciones, la revisión sistemática más reciente hasta la fecha publicó una prevalencia mundial que oscila entre el 0,01% y el 4,36%, con una mediana de 1 caso cada 154 personas. Los estudios incluidos contaron con tamaños muestrales amplios, llegando hasta los 50 millones de participantes. Aunque la mayoría de los estudios se realizaron en EE.UU. y en países del norte de Europa, esta revisión incorporó también datos de regiones anteriormente subrepresentadas como África y Oriente Medio (12) (Figura 1).



**Figura 1. Prevalencia global del TEA.** Disponible en [www.autismprevalence.thetransmitter.org](http://www.autismprevalence.thetransmitter.org).

El TEA se diagnostica con mayor frecuencia en varones que en mujeres, con una proporción de 4 a 1, lo que ha llevado a proponer la hipótesis del “efecto protector femenino” (13). Esta teoría sugiere que las diferencias neurobiológicas relacionadas con el sexo podrían hacer que las mujeres requieran síntomas más intensos para ser diagnosticadas, presentando a menudo casos más graves. Aunque las razones de esta disparidad no están completamente claras, se han planteado varias explicaciones: las niñas suelen tener mejores habilidades sociales y comunicativas, lo que puede ocultar los síntomas; los instrumentos de detección y diagnóstico actuales no están suficientemente adaptados para identificar el TEA en mujeres; y los sesgos de género en las evaluaciones clínicas pueden llevar a los profesionales a diagnosticar otras condiciones en niñas y mujeres adultas (13–16).

### **Epidemiología en EE.UU.**

Los últimos datos comunicados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades aportados por la Red de Vigilancia del Autismo y las Discapacidades del Desarrollo han revelado cifras más altas que las estimadas anteriormente, con una prevalencia de 1 por cada 36 niños de 8 años de edad (2,8%), sin discriminación según razón o nivel económico (17).

### **Epidemiología en Europa**

Entre 2015 y 2020, se llevó a cabo un estudio en 11 países europeos, que incluyó a niños de entre 5 y 18 años. Los resultados mostraron una prevalencia mediana del 1% y una media del 1,97%. Islandia, Reino Unido y Rumanía presentaron los índices más altos (>1,3%), mientras que Francia, Polonia y Lituania los más bajos (>0,7%). En el caso de España, la prevalencia se situó en un rango entre 0,7% y 1,0% (18).

Las limitaciones de esta revisión son similares a las observadas en estudios previos sobre la población de EE.UU., y podrían atribuirse a las desigualdades en el registro y seguimiento de pacientes, influenciadas por las políticas sanitarias de cada país. Además, la inclusión de solo nueve artículos originales en esta revisión reduce la solidez de los resultados obtenidos.

## Epidemiología en España

En España, no existe un registro oficial centralizado que permita hacer un seguimiento exhaustivo de los casos y conocer la prevalencia exacta a nivel nacional. Sin embargo, se han realizado varios estudios epidemiológicos (10,19–26) y se están impulsando iniciativas como el **Registro de Personas con TEA** (<https://retea.isciii.es>), cuyo objetivo es mejorar tanto la calidad de vida como el funcionamiento psicosocial de los niños y sus familias.

Las cifras obtenidas en España se asemejan a las comunicadas a nivel mundial y se refleja también en los datos estadísticos sobre alumnado no universitario escolarizado en enseñanzas obligatorias que ha publicado el Ministerio de Educación, Formación Profesional y Deportes a lo largo de los últimos 11 cursos escolares. Según los datos del periodo 2022-2023, 1 de cada 4 niños presentan criterios de diagnóstico TEA, situando a los TEA como la categoría más numerosa (29%) dentro del alumnado con necesidades educativas especiales por discapacidad. De este grupo, el 82,2% son niños y el 17,8% niñas en educación no universitaria (27).

A pesar de este crecimiento en el número de diagnósticos, el autismo sigue siendo una condición desconocida para gran parte de la población española. Esta falta de conocimiento tiene un impacto negativo en la calidad de vida de las personas TEA y sus familias, limitando su participación en la sociedad y su acceso a la igualdad de oportunidades. Solo a través de una mayor comprensión de la singularidad y especificidad de la condición, será posible identificar las necesidades de las personas que lo padecen, así como ser capaces de proporcionar los recursos y apoyos necesarios que precisan para mejorar su calidad de vida y promover su inclusión en todos los ámbitos de la sociedad.

---

## 5. FACTORES DE RIESGO: GENÉTICOS Y AMBIENTALES

A pesar de los avances y las investigaciones llevadas a cabo sobre el TEA desde su categorización y clasificación, la etiología sigue sin comprenderse plenamente a nivel científico. Aunque se acepta la presencia de causas multifactoriales, con base genética y una amplia variedad de fenotipos observados, los factores ambientales han adquirido

relevancia. Además, no existen dos niños con TEA con la misma sintomatología, existiendo notables diferencias de afectación incluso en el caso de gemelos (28). En los últimos años, numerosos grupos de investigación centran sus estudios en la posible implicación de la microbiota intestinal en el desarrollo del TEA que puede justificar todo lo anterior.

La investigación de las bases del autismo ha ido muy ligada a los avances tecnológicos de los últimos 30 años. De manera que, con el auge de la genética, todos los esfuerzos se centraron en buscar una base genética que justificase la condición, aunque esto solo explica el 16-17% de los casos (29).

Con la aplicación de las técnicas de secuenciación al análisis de la microbiota junto con la importancia que se les ha otorgado a los microorganismos comensales, se ha empezado a dar relevancia a la implicación de la microbiota intestinal y los factores que contribuyen a su desestabilización para justificar la etiología del TEA.

### **Factores genéticos**

Durante la última década, se ha producido un avance significativo en el estudio genético del autismo gracias al uso de tecnologías como la secuenciación del genoma, la bioinformática y la biología computacional. Estas herramientas han permitido analizar variaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) para identificar vínculos entre ciertos genes, características clínicas y fenotipos observados en personas con autismo. Estudios como los de asociación a nivel genómico han sido clave para descubrir interacciones entre genes y proteínas, rutas biológicas implicadas y funciones moleculares relevantes para el desarrollo del sistema nervioso.

En el caso del TEA, varios estudios han estimado una heredabilidad entre el 40% y el 90% (30,31). El valor más aceptado en la actualidad se sitúa alrededor del 80%, indicando una fuerte contribución genética (32). Las personas con antecedentes familiares de TEA suelen presentar mutaciones genéticas, aunque no siempre se detectan alteraciones cromosómicas en los análisis con microarrays (33). Esta técnica permite detectar variaciones en el número de copias del ADN, incluyendo aquellas que no son visibles en un cariotipo convencional, y es referencia en el diagnóstico de genes

involucrados en el TEA. Sin embargo, la tecnología de secuenciación masiva permite identificar otros cambios genéticos más sutiles. Se estima que aproximadamente un 20% de los casos de TEA presentan deleciones que afectan uno o varios genes, así como mutaciones puntuales *de novo* (29).

Los estudios genéticos han identificado asociación con más de 2.000 polimorfismos agrupadas en ciertas regiones del genoma (*loci* de riesgo). Además, estas zonas están repartidas por todos los cromosomas humanos, en un genoma que contiene aproximadamente 20.000 genes (33). Muchos genes asociados a TEA presentan alteraciones en el cromosoma X (33) y están involucrados en funciones esenciales del neurodesarrollo como la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica (*CNTNAP2*, *Neurologina-3-4*, *DAT*, *mGluR*), la dinámica del citoesqueleto (*SHANK3*, *NBEA*, *ANK3*), la síntesis y degradación de proteínas (*mTOR*, *TSC2*, *UBE3A*, *PAM/MYCP2*), la remodelación de la cromatina (*POGZ*, *G9a*, *GLP*, *DISC1*), la transcripción y la homeostasis lipídica (*ABCA13*) (33–35). Otras variantes genéticas se asocian a genes codificantes para neurotransmisores y sus receptores, transportadores, oncogenes, proteínas de señalización y de la vía de la ubiquitina, moléculas de adhesión celular neuronal y epigenéticas.

En cuanto a los síndromes genéticos, destacan el síndrome de X frágil, asociado a una mutación en el gen *Fragile X Mental Retardation gene 1 (FMR1)* con una afectación más grave en hombres que en mujeres; el síndrome de Rett, causado por la mutación de pérdida de función del gen *methyl-CpG-binding protein 2* que ocurre casi exclusivamente en el sexo femenino; y el síndrome de Angelman asociado a una mutación de pérdida de función del gen que codifica para la proteína ubiquitina ligasa. Finalmente, el complejo de esclerosis tuberosa es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en el gen *TSC1* o *TSC2* que codifican para proteínas que actúan como complejo que inhibe a *mTOR*, y se caracteriza por la aparición de tumores benignos en el cerebro (33,34).

Aunque los polimorfismos genéticos no explican la mayoría de casos de TEA (alrededor del 3% en población general) (36), tienen un enorme valor en la investigación. Ayudan a comprender cómo se desarrolla el autismo a nivel biológico, lo cual puede

orientar futuros diagnósticos e intervenciones. De hecho, una sola mutación *de novo* que inactiva un gen clave puede tener más impacto en el riesgo de autismo que la combinación de muchas variantes genéticas comunes que, juntas, aumentan el riesgo de esquizofrenia.

### **Factores ambientales**

Aunque la influencia genética es relevante, diversos estudios han señalado la influencia de los factores ambientales en el riesgo de desarrollo TEA. La variación en un rasgo puede ser debida a factores genéticos, ambientales o una combinación de ambos. En este contexto, se ha estimado que los factores ambientales son determinantes en un 40-50% de los casos (35). Entre estos factores se incluyen la edad parental, la nutrición materna y el entorno fetal, la exposición a medicamentos y sustancias tóxicas (35,37).

Uno de los factores ambientales más estudiados es la **edad avanzada de los padres**, particularmente la paterna (37,38). Asimismo, otros **factores prenatales, natales y perinatales** (39) asociados con estados de hipoxia han demostrado incrementar la susceptibilidad al TEA tales como el parto por cesárea, la inducción del parto, el parto prematuro (inferior a 36 semanas de gestación) o el embarazo postérmino (superior a 42 semanas de gestación) y condiciones de sufrimiento fetal (38). Estos hechos coinciden con la existencia de tres regiones cerebrales particularmente vulnerables a la falta de oxígeno: hipocampo, ganglios basales y ventrículos laterales; que se encuentran comúnmente afectadas en individuos con autismo (37,40).

**La salud materna** desempeña un papel crucial en el riesgo de desarrollar TEA, especialmente el **sistema inmunológico materno** (41). Más allá de la presencia de infecciones o enfermedades autoinmunes específicas, se ha evidenciado que la elevación de marcadores inflamatorios y anticuerpos durante el embarazo puede tener un impacto significativo en el riesgo de padecer TEA. Estados de **desnutrición, dietas restrictivas o deficientes en nutrientes esenciales y/o micronutrientes** como vitaminas y oligoelementos, e incluso intervalos cortos entre embarazos, han sido identificados también como factores de riesgo. Recientemente, se ha prestado atención al papel de la vitamina D, el hierro, cromo, manganeso y, especialmente, el zinc debido a su participación en procesos clave del neurodesarrollo. El zinc interviene en la formación

del tubo neural y la regulación del sistema inmunológico. Además, participa en la neurotransmisión, siendo liberado en las terminales presinápticas y transportado a neuronas postsinápticas a través de canales como los receptores ionotrópicos de glutamato y canales dependientes de calcio. Su deficiencia se ha relacionado con la aparición de síntomas del TEA, mientras que la suplementación durante el embarazo ha demostrado beneficios potenciales, como la reducción del riesgo de defectos del tubo neural (35).

Algunas enfermedades metabólicas en la madre como el **sobrepeso y la obesidad** también han mostrado una asociación con el TEA, aumentando el riesgo en un 28% y 36%, respectivamente (35). Del mismo modo, la presencia de otras comorbilidades como *Diabetes mellitus*, tabaquismo, consumo de alcohol y el uso de ciertos fármacos durante la gestación puede incrementar significativamente dicho riesgo (38). En el caso de la **diabetes**, el riesgo aumenta hasta un 62%, alcanzando un 74% en la forma pregestacional y un 43% en la gestacional (35,38).

Por último, la seguridad de los **medicamentos** administrados durante el embarazo continúa siendo un desafío. El consumo de ácido valproico y antidepresivos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina se ha asociado con un mayor riesgo de malformaciones congénitas, retraso en el desarrollo y disfunciones cognitivas, estimándose un incremento del riesgo de hasta el 50 % en el caso de los inhibidores de la recaptación de serotonina (37). Asimismo, varios estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de **antibióticos** en los primeros años de vida del niño puede incrementar el riesgo de padecer enfermedades del neurodesarrollo (42–44). Además, la exposición prenatal a **xenobióticos tóxicos, metales pesados, organofosforados y contaminantes ambientales**, tanto no persistentes como los ftalatos y el bisfenol A, como persistentes como los bifenilos policlorados y pesticidas organoclorados, se ha vinculado con toxicidad mitocondrial y alteraciones en mecanismos moleculares involucrados en el neurodesarrollo (45).

---

## 6. TRATAMIENTO DEL TEA

El TEA representa la principal causa de discapacidad en niños menores de cinco años y, con frecuencia se acompaña de un elevado sufrimiento de los familiares, así como una

demanda constante de apoyos especializados y recursos intensivos en la comunidad. Esta situación implica una considerable carga emocional, física y económica tanto para las familias como para el sistema sociosanitario. Además, la variabilidad interindividual es un desafío para el desarrollo de protocolos terapéuticos estandarizados y eficaces.

La terapia actual se basa en un abordaje multimodal e interdisciplinario, incluyendo intervenciones conductuales (análisis conductual aplicado, modelo Denver de intervención temprana), psicoeducativas (entrenamiento en habilidades sociales), del lenguaje y la comunicación (terapia del habla y lenguaje, sistemas aumentativos y alternativo de comunicación), ocupaciones y sensoriales, apoyo familiar y psicoeducación y, solo cuando está indicado, apoyo farmacológico (antipsicóticos atípicos, estimulantes y antidepresivos) (46).

La complejidad y heterogeneidad clínica inherente al TEA limita la eficacia de las terapias actuales, y aunque están orientadas a mejorar la calidad de vida, no han demostrado resultados concluyentes en términos de eficacia (47). Esta diversidad constituye un factor crítico que condiciona tanto el diseño de intervenciones terapéuticas como la orientación de las investigaciones futuras. Las tendencias actuales basadas en la medicina personalizada persiguen optimizar las intervenciones con la adaptación a los perfiles clínicos específicos de cada sujeto. Recientemente, se ha puesto de manifiesto la elevada prevalencia de las comorbilidades gastrointestinales en el TEA, relacionándose también con la implicación del microbioma intestinal en la etiología. Algunas de estas intervenciones incluyen dietas libres de gluten y/o caseína, suplementación con probióticos y transferencia de microbiota fecal (48). Aunque todas estas intervenciones son cuestionadas por su limitada evidencia científica, se detallan a continuación.

### **6.1 Dietas libres de gluten y caseína**

Una dieta libre de gluten y caseína es aquella que elimina todos los granos de los cereales que puedan contener gluten, como trigo, centeno, cebada, espelta y algunas variedades de avena, así como sus derivados, incluyendo harinas, sémolas, almidones y féculas. De igual modo, se excluyen todos los productos lácteos que contengan caseína.

La eficacia de estas dietas en el TEA continúa siendo objeto de debate, y los metaanálisis recientes han sugerido que esta intervención dietética puede contribuir a la reducción de determinados síntomas, particularmente aquellos relacionados con comportamientos estereotipados y restrictivos, dificultades en la interacción social y alteraciones comunicativas (49). Entre las principales hipótesis establecidas que intentan explicar estos efectos se incluyen el exceso de péptidos con actividad opioide derivados del gluten y la caseína, la alteración del microbioma intestinal y el potencial alérgeno de las proteínas del gluten y la caseína.

La **hipótesis de los péptidos opioides** postula que, tras la hidrólisis de las proteínas del gluten, particularmente la gliadina, y la caseína, se generan péptidos bioactivos con función similar a los opioides endógenos. Estos compuestos atraviesan la mucosa intestinal, especialmente si existe un aumento de su permeabilidad, condición común en niños con TEA, y estimulan el sistema inmune desencadenando una serie de reacciones proinflamatorias con liberación de citoquinas y otros mediadores. Esta inflamación intestinal promueve la disfunción de la barrera epitelial, permitiendo que péptidos y toxinas accedan al SNC, contribuyendo potencialmente a la neuroinflamación y consecuente aparición de síntomas central del TEA (50).

Asimismo, estos derivados opioides contribuyen activamente a la **alteración del microbioma intestinal** caracterizado por un incremento en la abundancia de *Bacteroidota*, *Clostridium*, *Caloramator*, *Sarcina*, *Desulfovibrio*, y *Lactobacillus*, y una reducción de *Haemophilus parainfluenzae* y *Bifidobacterium* (51). Dicha alteración contribuye a amplificar la permeabilidad intestinal y perpetuar el ciclo de inflamación, neurotoxicidad y manifestación de síntomas en el TEA.

Por otro lado, estos compuestos también **interfieren con los mecanismos de detoxificación endógena**, inhibiendo sistemas antioxidantes como el glutatión y la S-adenosil-metionina (50,52), lo que puede favorecer la acumulación de toxinas y contribuir a procesos de neurotoxicidad y neuroinflamación persistente.

Finalmente, tanto el gluten como la caseína son reconocidos como **potentes alérgenos** capaces de inducir respuestas inmunes mediadas por inmunoglobulinas IgA e IgG, estados inflamatorios que perpetúan la disfunción de la barrera intestinal (49).

En conjunto, estos mecanismos fisiopatológicos sustentan la teoría de que un intestino permeable facilita la translocación de sustancias neurotóxicas y proinflamatorias. Esta exposición crónica podría estar relacionada con la neuroinflamación sostenida y con la manifestación de síntomas característicos del TEA. Si reducimos la cantidad de sustancias nocivas, tanto para nuestro tracto gastrointestinal como para nuestro SNC, una dieta libre de gluten mejoraría tanto los síntomas centrales como los digestivos (53).

## 6.2 Prebióticos, probióticos y transferencia de microbiota fecal

En los últimos años se han publicado estudios de intervención basados en la utilización de prebióticos, probióticos, simbióticos (combinación de prebióticos y probióticos) y terapia de transferencia de microbiota fecal (54–58). La comunidad científica pretende conocer el alcance de este tipo de intervenciones a nivel de la restauración de la microbiota intestinal, la reducción de síntomas gastrointestinales, así como los síntomas centrales.

Los **prebióticos** son ingredientes fermentados selectivamente tales como almidón resistente, polisacáridos no almidonados, oligosacáridos, galactooligosacáridos y xilooligosacáridos. Se trata, por lo tanto, de fibras dietéticas funcionales que estimulan el crecimiento de una o varias cepas bacterianas que habitan el tracto gastrointestinal, modificando su composición y actividad, logrando así una mejora en la salud y el bienestar del huésped (54). Los **probióticos** son microorganismos vivos que confieren efectos saludables cuando se administran en cantidades adecuadas. Los probióticos utilizados habitualmente son las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *Escherichia coli* y *Bacillus* (59). La **transferencia de microbiota fecal** es un procedimiento que consiste en administrar la microbiota intestinal de un donante sano, obtenida a partir de sus heces, a un sujeto receptor. En los primeros años, se administraba mediante colonoscopia o sonda nasogástrica, pero cada vez se orienta más hacia la administración oral por cápsulas y se utilizan las heces de donantes universales (60).

Los resultados publicados en metaanálisis recientes (55,56,61) demuestran que estas intervenciones provocan cambios en los síntomas cognitivos, intestinales y en la composición de la microbiota intestinal.

**Los estudios con prebióticos en el TEA** son escasos y los productos empleados son polvo de zanahoria, goma guar parcialmente hidrolizada, vitamina A y galactooligosacáridos. Los resultados encontrados muestran distintas opiniones sobre la mejora significativa en la sintomatología cognitiva. Se encontró una disminución significativa en la diversidad microbiana, y reducción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ), tras la aplicación de la dieta prebiótica basada en goma guar y  $\beta$ -endoglucanasa producida por una cepa de *Aspergillus niger* (62). Por otro lado, se ha reportado un aumento significativo de la familia *Lachnospiraceae*, además de cambios significativos en los metabolitos fecales y urinarios, y en el comportamiento antisocial de los niños con TEA después de la intervención prebiótica basada en galactooligosacáridos (63). Otro estudio también ha encontrado un aumento significativo en la proporción Bacteroidota/Bacillota después de un suplemento de vitamina A (64).

**Los estudios con probióticos** son limitados y con resultados dispares en relación con sus efectos en la sintomatología TEA, gastrointestinal, diversidad microbiana y sobre el sistema inmune. Las cepas probióticas utilizadas en los diferentes ensayos se basan en los géneros bacterianos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Algunos estudios encuentran mejoras significativas en la gravedad del TEA al administrar *Lactobacillus acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* (64–67). Otros, demuestran mejoría de los síntomas gastrointestinales (65,68–70) y en combinación con un programa de entrenamiento conductual (68). Con respecto a los efectos sobre la composición de la microbiota intestinal, algunos estudios observan un aumento significativo de la abundancia de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, una reducción del género *Clostridium* y *Candida*, y una normalización del ratio Bacteroidota/Bacillota (65,67,69,71,72). Por último, en cuanto a los efectos sobre el sistema inmune, algunos encuentran mejoras en los marcadores inflamatorios (70,72). El último meta-análisis realizado hasta la fecha (56) sostiene que la utilidad de la terapia con probióticos reside en modular la respuesta inflamatoria del

organismo, reduciendo los marcadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ . En este contexto, los **psicobióticos** han surgido como una subcategoría de probióticos con capacidad de modular el eje microbiota-intestino-cerebro (MIC), ejerciendo efectos sobre el desarrollo cerebral y el comportamiento (73). Estas bacterias no solo modifican la composición del microbioma intestinal, sino que también poseen propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, y participan en la regulación de hormonas, metabolitos y neurotransmisores clave implicados en el funcionamiento cerebral (74).

Los psicobióticos han sido evaluados en el tratamiento de trastornos como la ansiedad, la depresión y, más recientemente, en enfermedades del neurodesarrollo como el TEA (56,61,74,75), así como en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (73,75–77). Los mecanismos de acción se han descrito tanto en modelos murinos como en ensayos clínicos en diversas poblaciones. Varios ensayos clínicos han evidenciado que la suplementación con psicobióticos puede reducir los niveles de ansiedad, depresión e inflamación sistémica. Asimismo, se han observado mejoras en funciones cognitivas, salud mental general, trastornos del movimiento y en la sintomatología gastrointestinal (77). Hasta la fecha, no se han reportado efectos adversos relevantes (56), aunque persisten importantes limitaciones y controversias en torno a su uso clínico.

Por último, otros trabajos demuestran el impacto positivo de la **transferencia de microbiota fecal** sobre los perfiles metabólicos, los síntomas gastrointestinales, TEA y la diversidad microbiana (78). Se ha comunicado mayor abundancia de *Bifidobacterium*, *Prevotella* (79,80) y *Desulfovibrio* (79) y disminución de *Bacteroides fragilis* (81). No obstante, los efectos de estas intervenciones suelen ser de corta duración, ya que, al poco tiempo de concluir el tratamiento, el individuo regresa a su estado inicial.

En conclusión, debido a la heterogeneidad de los resultados obtenidos en las distintas intervenciones analizadas, resulta difícil establecer conclusiones definitivas. La mayoría de los estudios presentan limitaciones importantes, entre las que destacan la falta de uniformidad en los criterios de inclusión, el reducido tamaño muestral y la amplia variabilidad en el tipo de intervenciones aplicadas. Por ello, los resultados deben interpretarse con cautela, ya que la evidencia empírica disponible aún no es suficiente

ni concluyente. Se requieren estudios futuros que aborden estas limitaciones metodológicas, tal como han señalado diversos metaanálisis (55,56,61), con el fin de avanzar hacia una comprensión más sólida y sistemática en este campo de investigación.

## II. EL MICROBIOMA INTESTINAL HUMANO

## 1. HISTORIA Y RELACIÓN CON LA SALUD Y LA ENFERMEDAD

El vínculo entre la microbiota intestinal y la homeostasis se ha contemplado desde la antigüedad; ya en el siglo IV a.C. **Hipócrates** anticipaba esta conexión al afirmar que “*toda enfermedad comienza en el intestino*”. Siglos más tarde, el premio Nobel de Medicina y Fisiología **Ilya Mechnikov** propuso que el envejecimiento y las enfermedades crónicas estaban influenciados por las toxinas producidas por bacterias intestinales y sugirió el uso de probióticos, en concreto, bacterias ácido-lácticas como estrategia terapéutica (82).

Durante el siglo XX, el estudio de los microorganismos intestinales tomó un rumbo más sistemático gracias al trabajo de **Sidney Finegold**, quien clasificó numerosas bacterias anaerobias intestinales y sentó las bases de la Microbiología Clínica actual. Sus investigaciones revelaron la importancia de estos microorganismos en la salud humana, y contribuyeron significativamente al conocimiento del género *Clostridium*, siendo pionero en observar su relación con el TEA (83).

Posteriormente, el término **microbioma** fue introducido y difundido con la connotación moderna en 2001 por el genetista y también premio Nobel **Joshua Lederberg** para describir la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que comparte un nicho ecológico, marcando un cambio de paradigma al reconocer su papel funcional en la fisiología del hospedador (84).

Actualmente, la comunidad científica define a la **microbiota** como el conjunto de microorganismos vivos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) residentes en un nicho ecológico determinado; y al **microbioma** que engloba los genes y metabolitos de todos los microorganismos (84–86). Esta distinción conceptual, a menudo empleada indistintamente, ha desembocado en una visión contemporánea de la microbiota no sólo como una comunidad simbiótica, sino como un órgano metabólicamente activo y un regulador clave de la fisiología del hospedador, con implicaciones profundas en procesos como la regulación de la inmunidad, el metabolismo, el desarrollo neurológico y la salud mental (87).

Los avances en las tecnologías de secuenciación, combinados con el desarrollo de herramientas bioinformáticas especializadas, han facilitado una caracterización más precisa y asequible de la microbiota. Gracias a estos progresos, ha sido posible dimensionar con mayor exactitud su verdadera magnitud: actualmente se estima que la relación entre células microbianas y humanas es de aproximadamente 1,3:1 (88) y que el número de genes microbianos en el organismo humano supera los 10 millones (89,90).

Los microorganismos colonizan diversas zonas del cuerpo humano, siendo las principales la piel, el tracto respiratorio superior, el tracto genitourinario y, especialmente, el tracto digestivo. El intestino alberga la mayor población microbiana del organismo e incluye levaduras, arqueas, helmintos, virus y protozoos (88). No obstante, hasta la fecha, la población bacteriana es la más ampliamente caracterizada. Entre las bacterias intestinales, predominan dos filos: Bacillota (anteriormente Firmicutes), que representan aproximadamente el 60 % de la comunidad bacteriana, y Bacteroidota (anteriormente Bacteroidetes), con cerca del 25 %. En menor proporción, se detectan otros filos como Pseudomonadota (anteriormente Proteobacteria), Verrucomicrobiota, Fusobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria y Spirochaetes (91). Se estima que la mayor densidad de microorganismos del tracto gastrointestinal se localiza en el ciego, observándose un gradiente creciente de diversidad a lo largo del tubo digestivo. Este patrón podría atribuirse tanto a factores ambientales específicos de cada órgano como a la propia capacidad adaptativa de los microorganismos (92,93). Existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad alfa y beta entre las regiones mucosa y luminal del intestino delgado y grueso. En este contexto, el filo Bacillota predomina en la mucosa tanto del intestino delgado como del grueso, así como en el lumen del intestino grueso, mientras que Pseudomonadota es más abundante en el lumen del intestino delgado (93). Estas diferencias podrían explicarse por las variaciones del pH, la concentración de sales biliares y la composición de mucina a lo largo del tracto intestinal (92), además de la disponibilidad de oxígeno.

En 2011, los análisis metagenómicos realizados con muestras procedentes de tres continentes permitieron clasificar la microbiota en tres enterotipos basados en su composición taxonómica. El enterotipo 1 se caracteriza por el predominio del género

*Bacteroides*; el enterotipo 2, por *Prevotella*; y el enterotipo 3, por *Ruminococcus* (94). Si bien esta clasificación ha sido considerada simplista y frecuentemente criticada por ocultar variaciones microbianas potencialmente importantes, puede resultar una herramienta útil para establecer asociaciones directas con enfermedades, realizar estratificaciones prospectivas en estudios clínicos, e incluso diseñar terapias personalizadas dirigidas a la modulación del ecosistema intestinal (95).

Este ecosistema microbiano complejo se encuentra en un estado dinámico de cambio a lo largo de la vida. La microbiota, que se adquiere desde el nacimiento, sigue un proceso de desarrollo paralelo y mantiene una estabilidad temporal, así como una diversidad, durante la adultez hasta el final de la vida. En las etapas de la infancia temprana y la vejez, la microbiota intestinal exhibe diferencias características tanto en la diversidad de los microorganismos presentes como en su abundancia en comparación con la microbiota de los adultos. Estos periodos de transformación podrían resultar especialmente influenciados por factores externos y, por tanto, potencialmente modulables mediante intervenciones, que además podría ejercer un fuerte impacto sobre la salud del hospedador (96). Son muchos los factores que afectan a la composición de la microbiota siendo los principales la dieta, la genética y epigenética, factores ambientales, el ejercicio, los fármacos y el modo de nacimiento (97).

El tracto gastrointestinal se divide funcional y anatómicamente en cavidad oral, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y grueso (ciego, colon y recto). Las características inherentes a estas regiones tales como el pH, las enzimas, la presencia de iones, oxígeno, sales biliares y moco van a diferenciar la composición del microbioma, así como sus funciones (92). Las funciones de la microbiota humana se clasifican en metabólicas, protectoras, estructurales y neurológicas (98). La microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la digestión de nutrientes, siendo responsable de la fermentación del 85% de los hidratos de carbono, de la degradación entre el 66% y el 95% de las proteínas y aminoácidos, así como de la totalidad de las grasas. En el intestino grueso, esta microbiota fermenta las fibras no digeribles transformándolas en ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ácidos orgánicos, alcoholes y gases. Asimismo, las proteínas son degradadas en péptidos, aminoácidos y metabolitos

con capacidad neuroactiva, como el óxido nítrico, la triptamina y la feniletilamina, o con potencial patogénico, como los compuestos aromáticos (fenol, *para*-cresol e indol) (99).

La dieta del individuo influye directamente en la composición de la microbiota intestinal, favoreciendo el crecimiento de determinados géneros bacterianos y, en consecuencia, la producción de metabolitos específicos. Las bacterias intestinales anaerobias (como *Bacteroides*, *Eubacterium* y *Clostridium* grupos XIVa y XI), aeróbicas (como *Actinobacteria* y *Proteobacteria*) y ácido-lácticas (como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) aportan las enzimas hidrolasas necesarias para la deconjugación de ácidos biliares, produciendo ácidos biliares secundarios como el deoxicolato, el ursodeoxicolato y el litocolato (100).

Se han identificado al menos ocho especies de bacterias intestinales implicadas en la metabolización de la colina, un nutriente hidrosoluble esencial, en acetaldehído y trimetilamina (TMA). Éste último posteriormente se oxida en el hígado, por las enzimas flavinas monooxigenasas, en N-óxido de trimetilamina (TMAO), asociado a procesos ateroscleróticos y enfermedades cardiovasculares (101).

Desde el punto de vista estructural, la microbiota contribuye al mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal y a la preservación de la capa mucosa protectora, funciones que están íntimamente relacionadas con su papel protector frente a la colonización o invasión por patógenos potenciales. El sistema inmunitario intestinal, compuesto por el tejido linfoide asociado al intestino y las placas de Peyer, se desarrolla como resultado de una estrecha interacción con los microorganismos comensales (102). Esta barrera inmunitaria, junto con diversos mecanismos inmunológicos, limita el contacto directo de los microorganismos comensales con la superficie epitelial.

Finalmente, la composición microbiana intestinal es clave para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica, mediante la regulación del equilibrio entre linfocitos T reguladores y células T CD4+ efectoras en la mucosa intestinal. Cualquier alteración significativa de esta microbiota puede inducir una respuesta inflamatoria mediada por células Th1, Th2 y Th17, lo que provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias, y con ello un incremento en la permeabilidad intestinal (103).

A nivel neurológico, la comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro, conocida como **eje intestino-cerebro**, ha demostrado tener una gran repercusión a nivel digestivo y cognitivo (104). Entre las consecuencias fisiopatológicas derivadas de una disfunción en este eje, destacan la exacerbación de trastornos inflamatorios intestinales, respuestas alteradas al estrés agudo y crónico, así como la aparición de alteraciones conductuales (105). Como resultado, el eje intestino-cerebro se perfila como un objetivo prometedor para el desarrollo de terapias personalizadas dirigidas a un amplio espectro de patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas y del neurodesarrollo, obesidad, y trastornos gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal o el síndrome del intestino irritable.

---

## 2. EL EJE MICROBIOTA-INTestino-CEREBRO: MECANISMOS DE COMUNICACIÓN

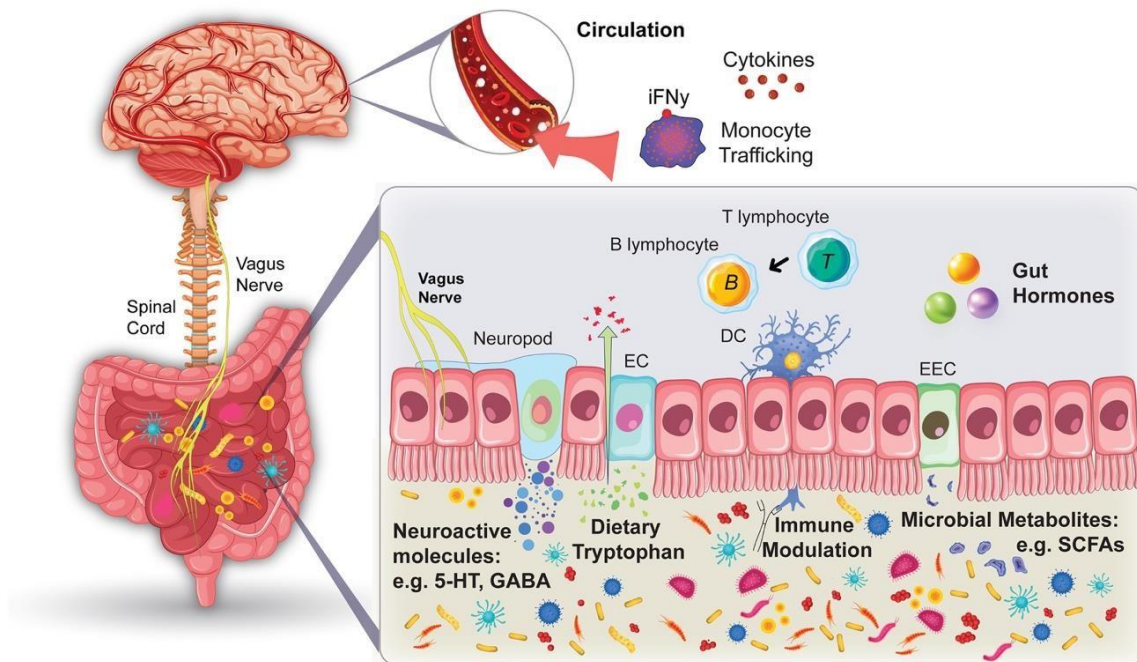
Los recientes avances en el campo de la Microbiología, desde un enfoque clásico centrado principalmente en el estudio de microorganismos patógenos causantes de infecciones agudas, hacia las tecnologías de secuenciación masiva, han permitido dimensionar y caracterizar con mayor profundidad la complejidad de la microbiota intestinal humana. Esta evolución ha transformado la manera en que entendemos la relación entre los microorganismos y la salud del hospedador.

En paralelo a los avances en el campo de la secuenciación masiva en Microbiología, la Neurociencia ha empezado a integrar estos descubrimientos, dando paso a un enfoque multidisciplinar que une Microbiología, Neurología, Inmunología, Endocrinología y Psicología permitiendo construir una visión más integral de los procesos fisiológicos y patológicos que conectan el intestino con el cerebro. Esta sinergia ha sido fundamental para el desarrollo del concepto del eje MIC, una compleja red de comunicación bidireccional que involucra señales nerviosas, inmunológicas, metabólicas y endocrinas (*Figura 2*) (106).

### 2.1 Vía neuronal: Sistema nervioso autónomo

El sistema nervioso autónomo conecta funcionalmente el SNC con los órganos periféricos a través del sistema nervioso periférico, y permite controlar procesos fisiológicos involuntarios como la respiración, el ritmo cardíaco, la presión arterial y la

digestión. Las neuronas preganglionares del sistema nervioso autónomo se originan en el SNC, específicamente en el encéfalo y la médula espinal, y se proyectan hacia ganglios autónomos en el sistema nervioso periférico, donde hacen sinapsis con neuronas posganglionares que inervan los órganos efectoros (107). Este sistema autónomo se divide anatómicamente en simpático, parasimpático y entérico. En combinación con el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, constituye una compleja red responsable de mantener la homeostasis fisiológica, así como de responder a señales endocrinas, motoras, autónomas y conductuales (108).



**Figura 2. Eje MIC.** Esquema que describe las diversas vías bidireccionales conocidas de comunicación entre la microbiota intestinal y el cerebro. Esta interacción incluye conexiones neuronales directas a través del nervio vago, el sistema nervioso entérico, los nervios espinales, así como la participación de neurotransmisores y metabolitos neuroactivos. También intervienen mediadores como los AGCC, las citocinas y los aminoácidos esenciales provenientes de la dieta; la modulación de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, y la señalización enteroendocrina, que influye en células dendríticas con capacidad de modular la actividad inmune y microglial. Además, participa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. AGCC (SCFAs), célula enteroendocrina (EEC), célula enterocromafín (EC), célula dendrítica (DC), serotonina/5-hidroxitriptamina

(5-HT), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), interferón gamma (IFN $\gamma$ ). Tomada de O’Riordan *et al.* 2025 (97).

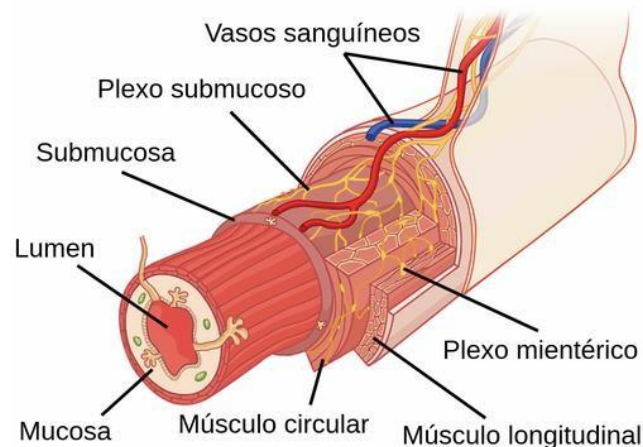
Mientras que el sistema simpático responde a un estado de actividad general elevada y aumento de atención, el parasimpático promueve procesos de descanso y digestión. Por su parte, el sistema nervioso entérico, está compuesto por vías reflejas que controlan la motilidad intestinal, la secreción y absorción y el flujo sanguíneo. A través del nervio vago puede inducir cambios en el intestino modulados por el SNC (108).

El **nervio vago**, también conocido como el par craneal X, constituye aproximadamente el 75% del sistema parasimpático e inerva la mayoría de las vísceras torácicas y abdominales. Las fibras parasimpáticas sacras inervan el colon descendente, sigmoide y el recto. Presenta cuatro cuerpos neuronales (núcleo dorsal, núcleo ambiguo, núcleo solitario y núcleo espinal trigeminal) situados en el bulbo raquídeo que transmiten la información de numerosos tractos nerviosos ascendentes y descendentes. Esta conexión permite que señales microbianas y metabólicas modulen respuestas del SNC, afectando a funciones como el estado de ánimo, el estrés, la inflamación y el comportamiento (109).

Las neuronas presinápticas de los sistemas simpático y parasimpático emplean acetilcolina como neurotransmisor. Sin embargo, las neuronas postsinápticas simpáticas generalmente producirán noradrenalina; mientras que las neuronas postsinápticas parasimpáticas liberan acetilcolina (107). Los neurotransmisores implicados en el sistema entérico son diversos y serán detallados más adelante. Asimismo, la microbiota también puede modular la actividad del sistema autónomo mediante la producción de metabolitos como AGCC, neurotransmisores (catecolaminérgicos, serotoninérgicos, GABA y dopamina) y otros compuestos que activan receptores neuronales en el intestino (99).

El sistema nervioso entérico inerva el tracto gastrointestinal a través de 200-600 millones de neuronas localizadas entre las capas musculares longitudinales y circulares del intestino o también llamadas plexo mientérico (de Auerbach), y el plexo submucoso (de Meissner), que controla la secreción y el flujo sanguíneo intestinal (**Figura 3**). El **plexo mientérico** regula la motilidad intestinal al estar compuesto por neuronas motoras

excitadoras e inhibitoras, que controlan las contracciones musculares; interneuronas, que transmiten las señales dentro del plexo; y neuronas aferentes primarias intrínsecas, que detectan distensión y cambios químicos. **El plexo submucoso** está compuesto por neuronas sensoriales de conducción lenta que detectan estímulos luminales; interneuronas y neuronas secreto-motoras y vasodilatadoras. Aunque este sistema presente una autonomía funcional, está modulado por el SNC a través del nervio vago y los nervios esplácnicos (107).



**Figura 3. El sistema nervioso entérico.** Adaptada de Waxenbaum *et al.* 2025 (107).

Existe una amplia variedad de neurotransmisores implicados en la regulación de las funciones intestinales que refleja la gran complejidad funcional del sistema entérico. La acetilcolina es el principal neurotransmisor excitador, mientras que el óxido nítrico participa en el control de esfínteres y en la coordinación del peristaltismo. El péptido vasoactivo intestinal estimula la secreción de agua y electrolitos en el intestino, relaja el músculo liso y actúa como vasodilatador local. La sustancia P aumenta la motilidad intestinal y la permeabilidad vascular. La serotonina, sintetizada mayoritariamente en el intestino (110), actúa sobre los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> participando en la activación de reflejos peristálticos y en la regulación de la secreción y sensibilidad intestinal. La somatostatina inhibe la secreción, la motilidad y el flujo sanguíneo intestinal. El GABA y el glutamato intervienen en la modulación local de la actividad neuronal entérica (111). Además, otros péptidos y neuromoduladores como la colecistoquinina, neurotensina, galanina y bombesina también están implicados en este complejo sistema.

Las neuronas entéricas expresan receptores *Toll-like* (TLR) para los cuales los componentes microbianos son agonistas y representan un mecanismo de comunicación inmunológica y metabólica entre los microorganismos y el hospedador. Esta relación le otorga un papel clave en la modulación de la inflamación intestinal, la percepción del dolor visceral e incluso en las funciones cognitivas del cerebro (112).

Las toxinas bacterianas pueden condicionar la función neuronal por diferentes mecanismos. Las enterotoxinas en particular, como la toxina colérica o la toxina termolábil de *E. coli*, pueden afectar al sistema entérico estimulando el reflejo secreto-motor e incluso ser diana de las neuronas sensitivas de la mucosa intestinal derivando en alternaciones gastrointestinales. La toxina A producida por *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) incrementa la actividad de las neuronas tipo AH y S de los plexos intestinales contribuyendo a los síntomas clínicos de hipersecreción, inflamación o dismotilidad intestinal asociados a las infecciones por esta bacteria anaerobia (112).

## 2.2 Vía inmune/hematógena

El tracto gastrointestinal alberga la mayor concentración de células inmunitarias del organismo y se encuentra en constante comunicación con nuestro microbioma intestinal. Existen dos tipos de respuestas inmunitarias que actúan de manera coordinada y entre los que existen nexos que permiten potenciar la respuesta: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (113).

El epitelio intestinal contiene diversos tipos de células, siendo las más abundantes los enterocitos. También se encuentran las células secretoras (caliciformes, células de Paneth y células neuroendocrinas), células madre intestinales, células M o *microfold* y células en cepillo (114). Gracias a la presencia de células caliciformes, situadas en el plexo submucoso, que secretan una capa de moco protector y viscoso, actúa como barrera física frente a los microorganismos. Los enterocitos expresan TLRs y otros receptores de reconocimiento de patrones como los receptores NOD-like y los receptores de manosa (lectina tipo C), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño celular (DAMPs) y permiten la interacción entre el hospedador y los microorganismos, otorgando una respuesta inmune innata. La activación del sistema inmune innato va a activar la expresión de genes que codifican

citocinas proinflamatorias, entre las que se incluyen TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-8. Por otro lado, el tejido linfoide asociado a la mucosa del intestino permite una respuesta adaptativa más específica, siendo mayoritariamente de isotipo IgA. Las células de Paneth, secretan defensinas y otros péptidos antimicrobianos, que ayudan a proteger frente a infecciones; y las células neuroendocrinas liberan compuestos como la grelina, somatostatina, colecistoquinina, péptido YY y serotonina, entre otros (102).

A través de la liberación de metabolitos y estimulación directa del sistema inmune, la microbiota intestinal tiene la capacidad de modular el estado inmunológico sistémico. Actualmente, se ha establecido que el SNC no constituye un compartimento inmunológicamente privilegiado, sino que se reconoce que estas señales procedentes del microbioma pueden atravesar la barrera hematoencefálica, promoviendo la activación o regulación de las células inmunitarias del cerebro (115,116). Finalmente, con el reciente descubrimiento de los vasos linfáticos duros, se ha podido tener una visión actualizada de las interacciones entre el SNC y el sistema inmune. Estos vasos son parte del sistema linfático, situado en la duramadre, que permiten el drenaje del líquido intersticial cerebral, eliminando productos de desecho, como las proteínas amiloides humanas, a los ganglios linfáticos periféricos y manteniendo la homeostasis del cerebro (116,117).

### **Inmunidad innata**

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra los patógenos, elaborando una respuesta rápida y eficaz mediante células derivadas de la línea mieloide, mastocitos y células *natural killer*, además del sistema de complemento (113).

El sistema inmune cerebral se compone principalmente de las células de la **microglía** (microgliocitos) y células de la **glía** (astrocitos y oligodendrocitos). La microglía pertenece al Sistema Fagocítico Mononuclear, son poblaciones de células mieloides de la inmunidad innata altamente especializadas. Restringidas al SNC, representan del 5% al 12% de todas las células del cerebro. Una vez diferenciadas, la microglía madura coloniza el parénquima cerebral, donde permanecen durante toda la vida gracias a una renovación gradual y autónoma, sin necesidad de reclutar otras células mieloides del sistema inmune (118). Diferentes estímulos pueden activar a los macrófagos para que

evolucione a poblaciones que poseen distintas funciones (119). Los metabolitos bacterianos y las citocinas, en particular el IFN- $\gamma$ , promueven un perfil proinflamatorio con la producción de TNF- $\alpha$ , citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18) y quimiocinas proinflamatorias (IL-8) que muestran una intensa actividad fagocítica y microbicida (activación clásica M1) y una mayor capacidad para actuar como células presentadoras de antígeno. En cambio, las citocinas IL-4 e IL-13, producidas por los linfocitos Th2, activan a los macrófagos en un perfil antiinflamatorio (activación alternativa M2) produciendo altos niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ , y muy bajos niveles de citocinas inflamatorias. De esta manera actúan controlando la inflamación y promueven la reparación tisular y la fibrosis. Este equilibrio entre la activación clásica M1 y la alternativa M2, es un factor clave en la defensa apropiada del ser humano frente a infecciones o al daño tisular (108,113,116).

Sin embargo, la microglía desempeña funciones fundamentales que trascienden la respuesta inmune, siendo esenciales en el desarrollo del SNC. Durante la embriogénesis, son las primeras células gliales en colonizar el SNC en formación, regulando procesos clave como la neurogénesis y la diferenciación celular, a través de la liberación selectiva de factores neurotróficos o neurotóxicos que modulan la supervivencia y maduración de los progenitores neuronales. Además, en la etapa postnatal, interviene en procesos de plasticidad neuronal, siendo clave en la poda sináptica, un proceso crítico para la formación adecuada de las conexiones sinápticas. Cualquier alteración en estos mecanismos, ya sea en estadios tempranos o avanzados del neurodesarrollo, puede tener un impacto significativo en la función cognitiva del recién nacido (119–121).

Los **astrocitos** son el tipo de célula glial más abundante, representando del 20% al 25% del volumen de la mayor parte de las áreas del encéfalo. Al igual que las células de microglía, presentan una amplia variedad de funciones entre las que se incluyen el control de la barrera hematoencefálica, regulación del flujo sanguíneo, soporte metabólico y antioxidante a las neuronas, reciclaje de neurotransmisores y contribuir a la homeostasis cerebral (sinaptogénesis y transmisión sináptica) (115). Una posible activación sostenida de los astrocitos podría justificar la neuroinflamación y ser

potencialmente responsable de enfermedades neurodegenerativas y del neurodesarrollo (121).

### **Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa es evolutivamente más reciente y reconoce al antígeno mediante mecanismos específicos. La base del reconocimiento de los diferentes patógenos es la existencia de una gran variabilidad de receptores (TCR y BCR), del orden de  $10^9$ - $10^{11}$  diferentes. Elabora una respuesta lenta y autolimitada, y su eficacia aumenta tras exposiciones repetidas al mismo antígeno (**memoria inmunológica**). En condiciones normales, se caracteriza por la ausencia de reactividad frente a lo propio (autotolerancia) (116).

**Los linfocitos T y B** constituyen los elementos celulares que participan en los mecanismos de reconocimiento de antígenos y determinantes antigénicos o epítopos (116). **Las células dendríticas** son células presentadoras de antígenos profesionales que, a diferencia de los linfocitos B y los macrófagos, son las únicas capaces de activar a los linfocitos T *naive*, desencadenando la respuesta inmune adaptativa. Expresan en su membrana receptores de reconocimiento de PAMP y DAMP y, en respuesta a su activación, migran a los ganglios linfáticos cervicales representando un nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Se han observado la coexistencia de las dos subpoblaciones de células dendríticas, las convencionales o mieloides y las plasmocitoides, en diversos compartimentos del SNC (122). Las células inmunitarias adaptativas, no sólo desempeñan funciones protectoras y homeostáticas, sino que también participan en procesos de neurogénesis y plasticidad neural. La deficiencia de linfocitos T provoca una neurogénesis hipocámpal defectuosa y déficits cognitivos (116).

### **2.3 Vía neuroendocrina: eje hipotálamo-hipofisario-adrenal**

Este eje es una vía neuroendocrina fundamental en la regulación de la respuesta al estrés y la homeostasis sistémica, cuyo inicio se sitúa en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo. Este eje se activa en respuesta a estímulos físicos o emocionales, que provocan la liberación de la hormona liberadora de corticotropina y la hormona antidiurética. Ambos péptidos actúan sobre la adenohipófisis, estimulando

la secreción de hormona adrenocorticotropa, la cual accede a la circulación sistémica y alcanza las glándulas suprarrenales donde induce la síntesis y liberación de glucocorticoides, principalmente cortisol en humanos (123).

El **cortisol** influye en el eje MIC a través de múltiples mecanismos. De forma directa, actúa sobre receptores de glucocorticoides expresados en células intestinales, incluyendo células epiteliales, inmunitarias y enteroendocrinas. Indirectamente, altera la motilidad intestinal, incrementa la permeabilidad de la barrera epitelial y afecta la capacidad de absorción de nutrientes, lo que conlleva a cambios en la composición y funcionalidad del microbioma intestinal. A nivel central, diversas regiones cerebrales como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal expresan receptores para glucocorticoides, permitiendo una acción directa del cortisol. Además, este puede modular funciones cerebrales de forma indirecta mediante la activación del nervio vago y de neuronas sensoriales del sistema nervioso entérico (124).

A nivel fisiológico, las funciones de los glucocorticoides no sólo se limitan a mejorar la disponibilidad energética y modular la respuesta cardiovascular y metabólica ante situaciones de estrés. También desempeñan funciones fundamentales en el organismo como modular la respuesta inmune, participar en el ritmo circadiano y presentar un efecto retroalimentador negativo sobre el hipotálamo y la hipófisis para inhibir su propia producción, como sistema regulador (125). En el sistema nervioso, contribuyen al desarrollo normal de procesos de plasticidad neuronal y mantienen la homeostasis con efectos sobre la memoria y la conducta. La activación de los receptores mineralocorticoides es necesaria para el proceso de evaluación y la recuperación de la memoria, mientras que los glucocorticoides favorecen la consolidación de la memoria y la adaptación conductual (126).

Sin embargo, el **estrés crónico** o prolongado puede conducir a una desregulación de este eje con repercusiones negativas sistémicas. Niveles elevados de cortisol producen alteraciones de la microbiota intestinal y de sus metabolitos, aumentando la permeabilidad intestinal y favoreciendo la sobreestimulación del sistema inmune. Todo ello, conlleva un estado de inflamación tanto a nivel intestinal como neuronal que, de

forma sostenida, actuaría como factor predisponente de enfermedades inflamatorias intestinales, y contribuiría a otras patologías del SNC (124).

---

### 3. METABOLITOS MICROBIANOS: PRODUCCIÓN Y FUNCIONES

El creciente interés por caracterizar no solo la composición taxonómica de la microbiota intestinal, sino también su genoma completo y su perfil metabolómico, el microbioma en su totalidad, ha permitido profundizar en su posible implicación en la etiopatogenia de trastornos relacionados con el SNC. Esta aproximación funcional ha impulsado la identificación de metabolitos neuroactivos microbianos, algunos de los cuales han mostrado capacidad moduladora sobre el eje intestino-cerebro, abriendo nuevas líneas de investigación sobre los mecanismos moleculares implicados en esta comunicación bidireccional.

#### 3.1 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Como se ha mencionado previamente, los AGCC (acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato, isovalerato y hexanoato) son **ácidos grasos saturados** producidos exclusivamente por bacterias a partir de la fermentación de la fibra dietética, siendo *Roseburia*, *Eubacterium rectale*, *F. prausnitzii* y *Clostridium* grupo IV y XIVa los principales géneros productores (127). Los AGCC predominantes son el acetato, el butirato y el propionato. El **acetato**, el más abundante, circula en sangre y sirve como fuente energética para tejidos periféricos, además de participar en procesos de lipogénesis y biosíntesis de colesterol en el hígado. El **butirato** es el principal sustrato energético para los colonocitos, interviene en la producción de cuerpos cetónicos y dióxido de carbono y regula la homeostasis intestinal (128,129). Por su parte, el **propionato** es absorbido por los colonocitos y transportado al hígado, donde puede ser metabolizado y cumplir funciones similares a las del acetato (130).

Es bien conocido que los AGCC son capaces de modular la permeabilidad intestinal a través de las uniones estrechas que conforman la capa mucosa intestinal, así como de la barrera hematoencefálica, ensalzando la idea de que una alteración de la barrera intestinal puede afectar de la misma manera a la permeabilidad cerebral (131).

Los AGCC se postulan como mediadores clave en la comunicación bidireccional del eje MIC (132). Se ha propuesto que los AGCC influyen en el funcionamiento psicológico a través de su interacción con receptores acoplados a proteínas G (131,133) o mediante la inhibición de histonas desacetilasas (134,135), ejerciendo sus efectos sobre el cerebro por vías humorales directas, rutas hormonales e inmunológicas indirectas, así como mecanismos neuronales. Los estudios de intervención dietética sugieren de forma indirecta un papel mediador de los AGCC en procesos cognitivos y emocionales (132), por lo que se recomienda su cuantificación en circulación sistémica cuando estos aspectos sean objeto de estudio. Los modelos animales han aportado evidencia directa sobre su capacidad de regular procesos de neuroinflamación que involucren al sistema inmune y el impacto en trastornos neuropsiquiátricos y el funcionamiento psicológico (118,136). Sin embargo, los estudios en humanos son escasos, presentan restricciones metodológicas y ofrecen resultados inconsistentes. En última instancia, podrían considerarse como agentes terapéuticos prometedores para modular las interacciones del eje microbiota–intestino–cerebro en humanos (132).

### 3.2 Metabolitos derivados de proteínas y aminoácidos

En el intestino delgado, las proteínas no digeridas son metabolizadas por acción enzimática en péptidos, aminoácidos y una variedad de metabolitos, principalmente mediante proteasas y peptidasas producidas por géneros como *Clostridium*, *Bacteroides* y *Lactobacillus*. Estos metabolitos pueden ser clasificados en: **AGCC** (isobutirato, 2-metilbutirato e isovalerato), **compuestos neuroactivos** (óxido nítrico, triptamina y feniletilamina), **derivados del azufre**, **compuestos aromáticos** (fenol, *para*-cresol e indol), **aminas biógenas** (espermina, espermidina y cadaverina) y **amonio** (137).

La microbiota intestinal está fuertemente influenciada por el patrón dietético. Una dieta proteica promueve la abundancia de *Bacteroides* y *Clostridia*, mientras que reduce la presencia de *Bifidobacterium adolescentes* (138). Además, la fuente de proteína también modula el perfil microbiano: la proteína de origen animal aumenta la presencia de los géneros antes mencionados, mientras que la proteína de origen vegetal favorece la proliferación de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Por su parte, la proteína de suero ha demostrado disminuir la abundancia de *B.fragilis* y *Clostridium perfringens*,

microorganismos patógenos implicados en la disrupción de la barrera intestinal y la producción de toxinas proinflamatorias (139,140).

La interacción entre los aportes proteicos de la dieta y los microorganismos comensales no sólo condiciona la elección alimentaria, sino que también influye en el comportamiento y funciones reproductivas (97).

La proporción de proteínas y carbohidratos puede activar o inhibir rutas catabólicas específicas. El catabolismo de proteínas, mediado por ciertos géneros bacterianos, genera aminoácidos, en especial tirosina, fenilalanina y triptófano, que participan en la biosíntesis de neurotransmisores como el GABA (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*), noradrenalina (*Escherichia*, *Bacillus*), dopamina (*Bacillus*), histamina y serotonina (*Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*). Este proceso también contribuye al equilibrio del metabolismo del nitrógeno en el huésped (98,141).

El triptófano es un precursor esencial para la síntesis de serotonina, triptamina, niacina (vitamina B3), cofactores redox NAD(P)<sup>+</sup> y otros metabolitos derivados del indol. Puede ser metabolizado por hasta seis rutas metabólicas (quinurenina, quinolinato, indol, ácido indolacético, ácido indolpropiónico y triptamina). Se han identificado cinco filos capaces de realizar estas rutas: Actinobacteriota, Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota y Fusobacteriota, los cuales podrían influir significativamente en el metabolismo de este aminoácido. A nivel de género, se observó que *Clostridium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus* mostraban una alta capacidad para generar metabolitos neuroactivos derivados del triptófano, destacando los dos primeros por su mayor potencial. Los niveles en la circulación sistémica de este aminoácido van a condicionar la inhibición de rutas de síntesis de neurotransmisores en el SNC en favor de otras relacionadas con la producción de otros metabolitos neuroactivos, como el indol, y sus derivados neurotóxicos, como el *para*-cresol (*p*-cresol) (142). En el apartado 4 de la presente tesis se profundizará en el papel del *p*-cresol y cómo afecta a enfermedades del neurodesarrollo.

### 3.3 Metabolitos derivados de la colina: TMA y TMAO

La colina es un nutriente esencial cuyo mayor aporte al organismo procede de la dieta. Existe una pequeña producción de colina a nivel endógeno en el hígado y en otras partes del cuerpo como en el cerebro a través de la vía fosfatidiletanolamina N-transferasa hepática. La colina se aporta en la dieta de dos maneras que difieren en su solubilidad. En la forma liposoluble (esfingomielina o fosfatidilcolina) mayoritaria y en la forma hidrosoluble (colina libre, fosfocolina o glicerofosfocolina) (101).

A pesar de que la síntesis de colina en el cerebro no está bien esclarecida, sabemos que existen actividades enzimáticas de la colina acetiltransferasa y fosfatidiletanolamina N-transferasa en los terminales neuronales, así como tres fuentes de colina esenciales: la colina libre almacenada en las membranas neuronales como fosfatidilcolina que atraviesa la barrera hematoencefálica, la colina que surge de la degradación de la acetilcolina por la enzima acetilcolina esterasa y la hidrólisis de la fosfatidilcolina debido a la actividad específica de las fosfolipasas (101).

Entre las funciones biológicas de la colina destaca su participación como precursor en la síntesis de fosfolípidos esenciales; donador de grupos metilo y en la síntesis de acetilcolina, regulando la neurotransmisión en diversas regiones del cerebro, entre las que se encuentran el control muscular, la regulación del estado de ánimo y la memoria (101).

Su absorción y metabolismo en el intestino dependen en gran parte de su estructura química y de la propia microbiota intestinal. En términos generales, el metabolismo de la colina comprende cuatro vías: la síntesis de betaína y dimetilglicina, fosfolípidos, TMA y acetilcolina. Por su relevancia en el contexto de la presente tesis, se desarrolla en detalle la vía de la TMA. La colina que no se absorbe en el intestino delgado, alcanza el intestino grueso donde se metaboliza en TMA por bacterias intestinales de los géneros *Anaerococcus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Proteus*, *Providencia*, y *Edwardsiella* (143). Tras su absorción es oxidada por las enzimas en TMAO y por los géneros *Prevotella*, *Mitsuokella*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter smithii*; y algunas especies de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* (137).

Las metilaminas han sido relacionadas tanto con efectos beneficiosos como perjudiciales para el organismo. En particular, concentraciones elevadas de TMAO se han asociado con un mayor riesgo de cáncer colorrectal, aterosclerosis y enfermedades cerebrovasculares. Estos procesos cobran especial relevancia en el ámbito neurológico, ya que patologías neurodegenerativas como la demencia y la enfermedad de Alzheimer presentan una fuerte relación con dichos eventos vasculares. Entre los efectos beneficiosos atribuidos al TMAO se encuentran la regulación de la insulina plasmática, el control de la glucemia y la atenuación de la inflamación en el tejido adiposo. De manera más específica, en el contexto de enfermedades neurodegenerativas y trastornos vinculados al mal plegamiento proteico, se ha demostrado que el TMAO podría ejercer un efecto terapéutico al corregir defectos de plegamiento de proteínas parcialmente desnaturalizadas y estabilizar entrópicamente sus conformaciones nativas (143).

#### 3.4. Metabolitos derivados de la fenilalanina

Los polifenoles alimentarios metabolizados por la microbiota intestinal pueden ejercer efectos tanto beneficiosos como perjudiciales sobre la neurotransmisión. Entre los metabolitos beneficiosos se encuentran el ácido 3-hidroxibenzoico (3-HBA), el ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico (3-HPPA) y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (3,4-diHBA) (144). En cambio, otros metabolitos como el ácido 3-(3-hidroxifenil)-3-hidroxi-propiónico (HPHPA), el ácido 3-hidroxifenilacético (HPA) y el ácido 3-hidroxihipúrico (HHA) se han asociado a efectos perjudiciales (145–148).

Los polifenoles ingeridos con los alimentos son transformados por la microbiota intestinal humana en compuestos fenólicos como 3-HPPA, 3-HBA y 3,4-diHBA. Gracias a su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, estos metabolitos pueden acumularse en el tejido cerebral y modular procesos de mal plegamiento, agregación y neurotoxicidad de proteínas como la  $\alpha$ -sinucleína y el péptido  $\beta$ -amiloide, tanto *in vitro* como en modelos animales (144,149). En este sentido, los metabolitos de los polifenoles derivados de la microbiota podrían tener un papel protector frente a la agregación proteica neurotóxica y a trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer y el

Parkinson. No obstante, debe considerarse que gran parte de la evidencia proviene de estudios *in vitro* y *ex vivo*, lo que limita la extrapolación directa a humanos.

Por otro lado, los metabolitos HPHPA, HPA y HHA se consideran productos alterados del metabolismo de la fenilalanina, relacionadas con el sobrecrecimiento de bacterias del género *Clostridium*, especialmente *C. botulinum* y *C. difficile*, especies productoras de neurotoxinas y esporas resistentes a la mayoría de los antibióticos que se utilizan (145). En este contexto, la fenilalanina de la dieta es convertida inicialmente en metil-tirosina, orto-tirosina y 2,3-dihidroxifenilalanina. La orto-tirosina actúa como sustrato en la síntesis de neurotransmisores catecolaminérgicos (dopamina, noradrenalina y adrenalina, mientras que la metil-tirosina puede ser transformada en ácido fenilpropiónico o metil-tiramina, dependiendo de si primero ocurre una reacción de desaminación o de descarboxilación respectivamente.

Estudios en modelos murinos han demostrado que la acumulación de metiltirosina produce neurotoxicidad (146). Asimismo, se ha observado que otros metabolitos derivados de este sustrato, como HPHPA y HHA, se asocian a alteraciones conductuales y comportamientos estereotipados, lo que sugiere un posible vínculo con enfermedades del neurodesarrollo y neurodegenerativas.

### 3.5. Proteínas amiloides

Las proteínas amiloides bacterianas se ensamblan en fibras amiloides altamente organizadas, ricas en estructuras  $\beta$ -plegadas. En bacterias cumplen funciones adaptativas beneficiosas para ellas (150). Los polímeros amiloides con estructura de lámina beta cruzada (*cross-beta-sheet*) como *curli* en *E. coli* o *TasA* en *Bacillus subtilis*, proporcionan estructura mecánica y adhesión en los biofilms, aumentando su resistencia frente a factores ambientales adversos (151). Se ha demostrado que algunos géneros del microbioma humano son capaces de ensamblar amiloides extracelulares, incluidos *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Mycobacteria*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Bacillus* (150,152,153). Otra funcionalidad que presentan es favorecer la colonización facilitando la adhesión inicial de las bacterias a las células humanas o incluso dispositivos médicos. Además, pueden activar receptores del sistema inmune

como TLR2 y TLR1/6 promoviendo respuestas proinflamatorias por citoquinas dando lugar a una inflamación crónica o alterar la respuesta inmune del huésped (154).

El hecho de que estas fibras se parezcan estructural y bioquímicamente a los amiloides patológicos humanos, como  $\beta$ -amiloide,  $\alpha$ -sinucleína, tau y la proteína *transactive response DNA-Binding protein*, ha dado lugar a numerosas investigaciones que plantean la hipótesis de que algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica tengan su origen en la microbiota intestinal (153).

La forma de transmisión de las proteínas amiloides es muy similar a la de los priones. Los priones se propagan mediante mecanismos de *self-seeding*, en la cual una proteína en conformación priónica induce a otra molécula de la misma proteína a adoptar una conformación amiloide. Este mecanismo acelera la fase cinética inicial de la amiloidogénesis (155). Además, el eje MIC juega un papel fundamental para poder entender la vía de entrada de estos agentes. Las enfermedades neurodegenerativas cursan con comorbilidades gastrointestinales como el estreñimiento o diarrea, que aparecen incluso antes de ser diagnosticadas, y se han encontrado depósitos de proteína amiloide en el núcleo motor dorsal del nervio vago (156). La exposición a amiloides microbianos en el intestino podría favorecer la nucleación cerebral de agregados de  $\beta$ -amiloide (152). Se ha demostrado que las proteínas patológicas, como la  $\alpha$ -sinucleína o el  $\beta$ -amiloide, pueden presentar especificidad de cepa, de manera análoga a las cepas en las enfermedades priónicas, lo que podría explicar los distintos fenotipos observados en trastornos neurodegenerativos (153).

---

#### 4. *P*-CRESOL

##### 4.1. Características bioquímicas y fuentes. Síntesis y metabolismo

El ***p*-cresol** (4-metilfenol, 4-cresol, para-hidroxitolueno) con fórmula molecular  $C_7H_8O$ , es un compuesto químico perteneciente a la familia de los cresoles, derivados del tolueno con un grupo hidroxilo (-OH) unido al anillo bencénico. Específicamente, en *p*-cresol, el grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) y el grupo hidroxilo están en posición opuesta (1,4) en el anillo aromático. En su estado físico se presenta como un líquido incoloro o ligeramente

amarillento, estable a temperatura ambiente pero oxidable en presencia de oxígeno. En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, debido a su naturaleza lipofílica, es moderadamente hidrosoluble y altamente soluble en solventes orgánicos (etanol y éter). Es un ácido débil ( $pK_a=10,26$ ), lo que influye en su grado de ionización a diferentes pH y, por tanto, en su biodisponibilidad y comportamiento en medios biológicos (157).

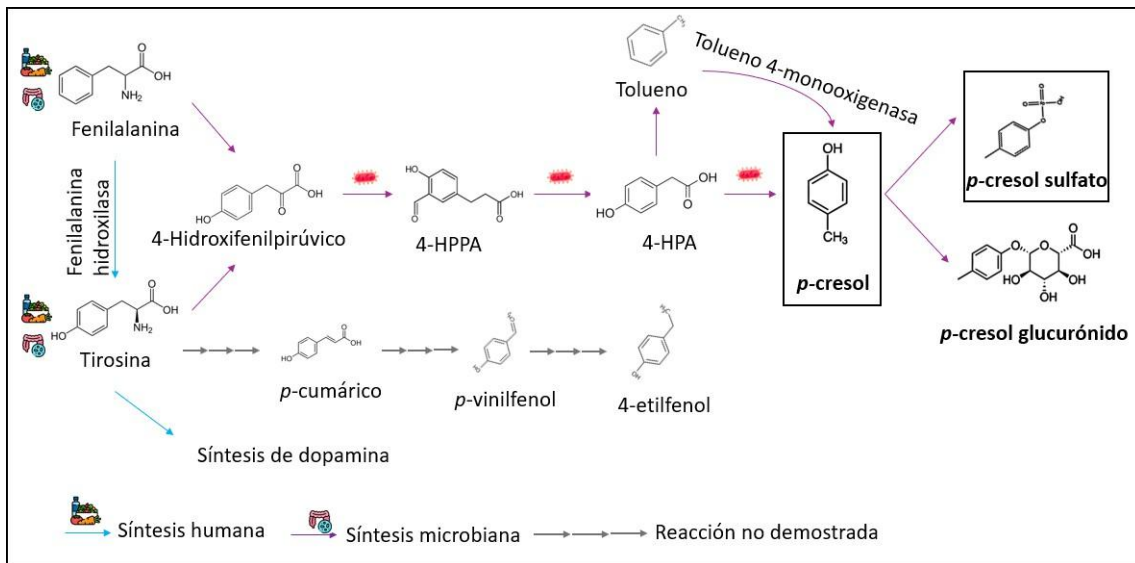
Los cresoles (*orto-*, *meta-*, *p*-cresol) están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentran en plantas, alquitrán de hulla, petróleo y en procesos volcánicos. La industria química contribuye a la **exposición ambiental** mediante la producción de herbicidas, desinfectantes, antioxidantes, colorantes, resinas y perfumes. Existen **alimentos** que contienen distintos isómeros de cresoles como los tomates, el ketchup, los espárragos, quesos, mantequilla, tocino y ahumados, así como bebidas como el vino tinto, el café (tanto crudo como tostado) y el té negro en concentraciones muy bajas (0,01 a 0,2 mg/l). (158). También se emiten desde incineradoras, durante la combustión de carbón y madera, a través de los gases de escape de vehículos, refinerías de petróleo y en el humo de los cigarrillos. La exposición a *p*-cresol a partir del humo de tabaco ambiental se ha estimado en  $0,41 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en adultos no fumadores (158). Por tanto, las vías de exposición humana son bastante comunes y, entre ellas, se encuentran la inhalación de vapores, el contacto dérmico y a través del agua y/o alimentos. Sin embargo, **la principal fuente de exposición es endógena** y proviene de la actividad metabólica de la **microbiota intestinal**, a partir de la fermentación de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina o a partir de tolueno (159). Comprender estas interacciones es clave para poder intervenir de forma dirigida sobre el microbioma en contextos clínicos como el TEA, donde el *p*-cresol parece desempeñar un papel patogénico relevante.

La tirosina es transformada por bacterias intestinales en 4-etilfenol y *p*-cresol, los cuales pueden ser metabolizados en 4-etilfenol sulfato y *p*-cresol-sulfato, respectivamente (160,161). En el caso de la fenilalanina, su metabolismo sigue una ruta similar, aunque carece del grupo 4-hidroxilo en su estructura. Este aminoácido puede ser hidroxilado a tirosina, lo que le permite ingresar a la misma vía metabólica de síntesis de *p*-cresol y 4-etilfenol. Inicialmente, se pensaba que sólo determinadas bacterias intestinales, concretamente aquellas que expresan la enzima 4-hidroxifenilacetato

descarboxilasa, como algunas especies de *Clostridioides* y una del género *Lactobacillus*, eran capaces de llevar a cabo la síntesis de *p*-cresol a partir de aminoácidos aromáticos (159). Sin embargo, el creciente interés en los intermediarios metabólicos de esta ruta, como el ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPA) y el ácido 4-hidroxifenilpropiónico (4-HPPA), ha permitido conocer que la capacidad de metabolizar tirosina y fenilalanina no está restringida a esas especies bacterianas. Actualmente, se ha identificado la participación de aproximadamente 10 géneros bacterianos en la producción de uno o ambos intermediarios. Entre estos se incluyen *Clostridioides*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Anaerostipes*, *Butyrivibrio*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* y *Eubacterium* (160). Este hecho refuerza la idea de que se trata de una ruta metabólica abundante presente en el microbioma intestinal humano. La segunda vía conocida de producción es a partir de la **tolueno monooxigenasa** expresada por varias especies del orden Pseudomonadales (*Pseudomonas mendocina* y *Stutzerimonas stutzeri*) (159). Debido a la mayor disponibilidad endógena de tirosina y fenilalanina en comparación con el tolueno, esta ruta microbiana se considera la vía principal de producción de *p*-cresol en humanos. Además, se han propuesto otras rutas metabólicas que aún no han sido demostradas. Una de ellas es la desaminación de la Tyr en ácido *para*-cumárico, que podría ser descarboxilado a *para*-vinilfenol y posteriormente reducirse a 4-etilfenol (Figura 4). Ambos productos podrían ser usados como precursores del *p*-cresol y 4-etilfenol (159,160,162).

Una vez que el *p*-cresol se absorbe a través de la mucosa intestinal y entra en la circulación portal es metabolizado principalmente por el hígado y, en menor medida, por las células epiteliales del colon (158). En el hígado, se conjuga mediante enzimas de fase II para convertirse en metabolitos más hidrosolubles y facilitar su eliminación. La vía metabólica predominante es catalizada por **sulfotransferasas** que transforman aproximadamente el 95% del *p*-cresol en *p*-cresol-sulfato (159). Un 4% es glucuronizado por acción de la UDP-glucuronosiltransferasa, aunque una pequeña fracción, alrededor del 1%, permanece en forma libre (163). Otras vías metabólicas secundarias incluyen la oxidación de la cadena lateral para formar el ácido *para*-hidroxibenzoico, y la formación de una quinona altamente reactiva (158). Por último, las tres formas (*p*-cresol, *p*-cresol-

sulfato y *p*-cresol-glucoronizado) son filtradas desde la sangre por el glomérulo renal y excretadas a través de la orina y las heces (159).



**Figura 4.** Síntesis de *p*-cresol y sus derivados a partir de la tirosina y/o fenilalanina.

Adaptada de Zheng *et al.* 2021 (160).

#### 4.2 Bacterias implicadas en la producción de *p*-cresol y/o sus precursores

La conversión de tirosina en *p*-cresol puede implicar varias etapas metabólicas intermedias, como la generación de 4-HPA y 4-HPPA, y diferentes microorganismos pueden participar en pasos específicos de esta vía, de forma directa o mediante mecanismos de alimentación cruzada.

Uno de los grupos más estudiados en relación con esta ruta metabólica es la familia ***Clostridiaceae***, particularmente las especies del género *Clostridioides*. En este contexto, *C. difficile* ha sido identificada como un productor destacado de *p*-cresol, gracias a la expresión de la enzima 4-HPA descarboxilasa, que cataliza la conversión de 4-HPA en *p*-cresol (164,165). Esta actividad confiere a la bacteria una ventaja ecológica frente a otras especies intestinales, ya que el *p*-cresol posee efectos antimicrobianos selectivos (166). No obstante, *C. difficile* no es la única especie involucrada. Hasta el momento se han identificado al menos otras 11 especies como *C. bartlettii*, *P. bifermentans*, *C. butyricum*, *C. clostridioforme*, *C. paraputrificum*, *C. perfringens*, *C. saccharolyticum*, *C. scatologenes*, *C. septicum* y *C. sporogenes* y una del género

*Peptostreptococcus* (*P. anaerobius*) con capacidad para producir *p*-cresol o sus precursores a partir de aminoácidos aromáticos (160,167,168).

Más allá del filo Bacillota, especies del género *Bacteroides* (familia *Bacteroidaceae*) también han demostrado capacidad para participar en esta ruta. Algunas, como *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* y *B. uniformis*, pueden generar *p*-cresol directamente a partir de tirosina, aunque en concentraciones significativamente más bajas. Otras especies como *B. ovatus* parecen intervenir en pasos previos, mediante la producción de intermediarios como el 4-HPA. A pesar de su limitada producción directa, la contribución de estos microorganismos podría ser importante desde una perspectiva ecológica, especialmente considerando su abundancia en el microbioma intestinal. Paradójicamente, algunos estudios en modelos animales han mostrado que ciertas especies de *Bacteroides* tienen efectos beneficiosos sobre la sintomatología del TEA, posiblemente al modular otros metabolitos como el 4-etilfenilsulfato, cuya reducción se ha asociado con mejoras conductuales (161).

Las bacterias de la familia **Bifidobacteriaceae** han sido históricamente consideradas como beneficiosas en el contexto del eje MIC. Algunas especies como *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. infantis* y *B. pseudolongum* fueron inicialmente señaladas como posibles productoras de *p*-cresol (160). Sin embargo, investigaciones posteriores matizaron estos hallazgos, sugiriendo que, si bien pueden generar pequeñas cantidades de 4-HPA, no participan directamente en la descarboxilación de *p*-cresol (169). Su papel podría estar más vinculado a una modulación indirecta del entorno intestinal o a interacciones metabólicas con otros taxones productores.

En el caso de la familia **Lachnospiraceae**, aunque la evidencia aún es escasa, ciertos géneros como *Anaerostipes* (*A. caccae*, *A. hadrus*), *Butyrivibrio* (*B. fibrisolvens*) y *Roseburia* (*R. intestinalis*, *R. inulinivorans*) han mostrado capacidad para producir *p*-cresol y 4-HPA (160). La abundancia relativa de estas bacterias se ha observado aumentada en algunos estudios de microbiota en pacientes con TEA, tanto en humanos como en modelos murinos, lo que sugiere una posible implicación en la generación de compuestos fenólicos asociados a disfunción neurológica (161,170). No obstante, estos

resultados aún no alcanzan significación estadística consistente, por lo que su relevancia funcional requiere de una mayor investigación (171).

Por su parte, algunas bacterias de la familia **Ruminococcaceae**, como *R. obeum*, *R. torques* y *Faecalibacterium prausnitzii*, también pueden contribuir a la producción de *p*-cresol y 4-HPA a partir de la fermentación de tirosina. Además, estas especies son capaces de metabolizar fenilalanina, generando otros compuestos aromáticos que podrían influir indirectamente en esta vía. Este perfil metabólico hace que su rol en la modulación del entorno neuroactivo intestinal sea particularmente interesante (172).

Finalmente, especies del género *Eubacterium* (familia **Eubacteriaceae**), como *E. rectale*, *E. cylindroides* y *E. hallii*, también han sido identificadas como potenciales productoras de 4-HPA y *p*-cresol, aunque en niveles muy bajos (169,172). Su impacto podría ser relevante en el contexto de comunidades microbianas complejas, donde incluso pequeñas cantidades de metabolitos pueden tener efectos fisiológicos significativos si actúan en sinergia con otros factores.

En conjunto, esta caracterización sugiere que la producción de *p*-cresol en el intestino humano es el resultado de una colaboración metabólica entre múltiples especies, algunas de las cuales pueden actuar de forma directa, y otras como proveedoras de precursores o moduladoras del entorno fermentativo.

#### **4.3 Mecanismos de acción propuestos del *p*-cresol y sus metabolitos. Potenciales efectos sobre la fisiopatología TEA**

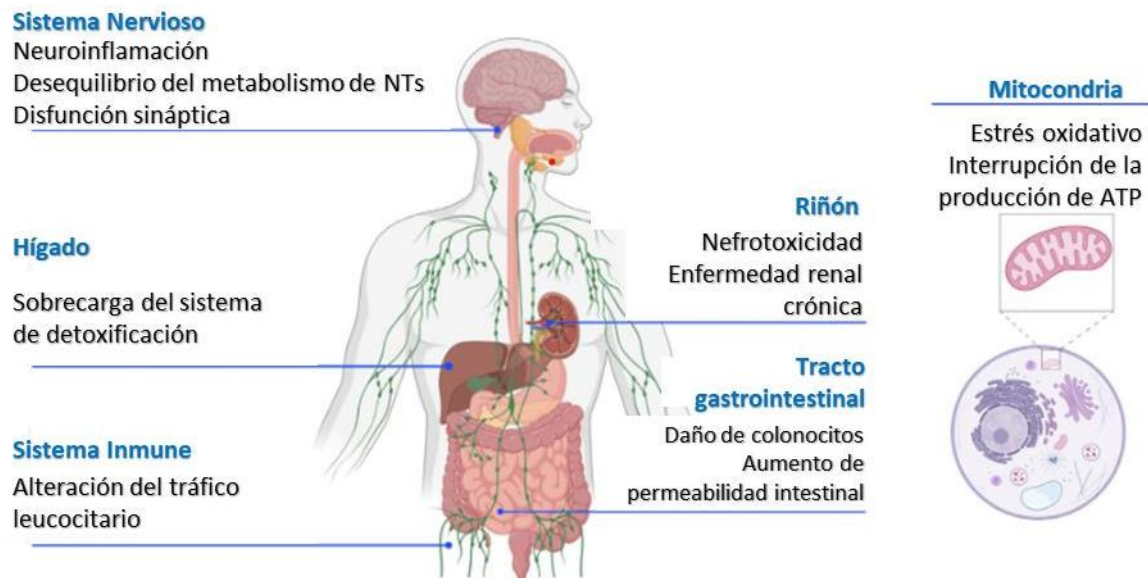
El *p*-cresol y sus principales metabolitos, especialmente el *p*-cresol-sulfato, no solo alcanzan circulación sistémica, sino que también muestran una notable actividad biológica multisistémica. Estas moléculas están clasificadas como toxinas urémicas de tipo fenólico, y su acumulación se ha asociado con alteraciones funcionales en órganos clave (160).

Tanto el *p*-cresol libre como la versión sulfato han demostrado tener capacidad para interferir con procesos fisiológicos en diversos sistemas, incluyendo el SNC, el tracto gastrointestinal, el sistema inmune, el sistema cardiovascular y la función mitocondrial, además de inducir estrés oxidativo. Su presencia se ha relacionado con

procesos de neuroinflamación, desregulación inmunológica, alteración de la barrera hematoencefálica, y disfunción en la comunicación neuroglial, todos ellos potencialmente implicados en la fisiopatología del TEA (173–175).

Aunque los mecanismos moleculares exactos aún no se han dilucidado por completo, estudios *in vitro* y en modelos animales han permitido proponer diversas vías implicadas, incluyendo la modulación de receptores neuronales y de señalización inmunitaria, la afectación del metabolismo energético celular y la influencia sobre sistemas de detoxificación y respuesta antioxidante.

En este apartado se revisan los principales **mecanismos de acción** propuestos para el *p*-cresol y sus derivados, junto con **los efectos fisiopatológicos** observados, con especial atención a su posible papel en el desarrollo y mantenimiento de síntomas relacionados con el TEA (Figura 5).



**Figura 5. Efectos fisiopatológicos del *p*-cresol y *p*-cresol sulfato.** Adaptada de Flynn et al. 2025 (178).

#### 4.3.1 Efectos sobre la mitocondria

Las mitocondrias desempeñan un papel central en la homeostasis celular, no solo como fuente principal de producción de ATP mediante la **fosforilación oxidativa**, sino también como reguladoras clave de procesos como la **apoptosis**, la **señalización celular**, la

**homeostasis del calcio intracelular y la producción de especies reactivas de oxígeno** (176–179).

En el contexto del TEA, diversos estudios han documentado **alteraciones funcionales mitocondriales**, que incluyen desde deficiencias en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria hasta una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere una contribución directa a la etiopatogenia del trastorno. Durante la fosforilación oxidativa, una pequeña fracción de electrones escapa de la cadena de transporte de electrones y reacciona con el oxígeno, generando especies reactivas de oxígeno. En condiciones fisiológicas, estos radicales libres son contrarrestados por sistemas antioxidantes. Sin embargo, se ha observado que tanto el *p*-cresol y la versión sulfato interfieren en la funcionalidad mitocondrial, promoviendo un aumento en la **fuga electrónica** y, por tanto, en la producción de especies reactivas de oxígeno, especialmente en **células neuronales e intestinales** (179). El exceso de especies reactivas de oxígeno puede inducir **daño estructural y funcional mitocondrial**, afectando al ADN mitocondrial, proteínas y lípidos de membrana, lo cual exacerba la disfunción y perpetúa un ciclo de retroalimentación negativa. Además, la reducción en la actividad de los complejos I, III y IV, particularmente en tejidos cerebrales, musculares y células tubulares renales, compromete la producción de ATP, lo que puede afectar a procesos críticos como la **maduración neuronal**, la **sinaptogénesis**, la **plasticidad cerebral**, así como funciones metabólicas en órganos periféricos como el **riñón** (176,179,180).

Esta disfunción mitocondrial incluye también alteraciones en los procesos dinámicos de fusión y fisión mitocondrial, esenciales para la adaptación al estrés celular. Asimismo, se ha observado una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes mitocondriales, como la **superóxido dismutasa mitocondrial**, que incrementa la vulnerabilidad celular frente al estrés oxidativo (178,179).

Este desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante mitocondrial da lugar a un **estado de estrés oxidativo crónico**, caracterizado por daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN, procesos ampliamente implicados en la disfunción neuronal y sistémica observada en el TEA (52,177).

#### 4.3.2 Efectos nefrotóxicos

En pacientes con TEA se ha objetivado una **elevada prevalencia de enfermedad renal crónica**. Cerca del **25% de los adultos con TEA y discapacidad intelectual** presenta algún grado de enfermedad renal crónica, lo que sugiere una posible asociación entre **la acumulación de toxinas urémicas** y el desarrollo o agravamiento de complicaciones sistémicas propias del TEA. Por este motivo la toxicidad renal inducida por *p*-cresol ha cobrado especial interés en el contexto del TEA (181).

En pacientes urémicos, *p*-cresol y su variante sulfato, se acumulan en pulmón, hígado, sangre, orina y, especialmente, en el riñón donde ejercen efectos tóxicos locales y sistémicos (157). De hecho, el *p*-cresol-sulfato y el indoxil sulfato son frecuentemente utilizados como biomarcadores pronósticos, ya que niveles elevados se asocian con mayor riesgo de mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica (182).

El *p*-cresol-sulfato entra en las células del túbulo proximal renal mediante los transportadores de ácidos orgánicos OAT3, lo que permite su acumulación intracelular y facilita también su paso a través de la barrera hematoencefálica (183). Una vez en el interior celular, el *p*-cresol-sulfato estimula la producción de especies reactivas de oxígeno, desencadenando un estado de **estrés oxidativo persistente**, que daña componentes clave de la célula renal, incluidas **mitocondrias, membranas lipídicas y ADN** (176,180). Se ha evidenciado una alteración de la filtración glomerular y la función tubular, comprometiendo la capacidad depurativa del riñón y perpetuando un círculo vicioso de acumulación de toxinas y deterioro progresivo de la función renal (182).

Además, otros metabolitos relacionados, como el 4-etilfenol y, su derivado sulfatado, 4-etilfenol sulfato, comparten similitudes estructurales con el *p*-cresol y el *p*-cresol-sulfato, respectivamente, confiriéndoles efectos biológicos similares, incluida la nefrotoxicidad. Aunque sus mecanismos de acción aún no se han dilucidado completamente, se ha reportado su implicación tanto en **el daño renal** como en **alteraciones conductuales**, incluyendo conductas relacionadas con la **ansiedad** y el **déficit de socialización** (184).

La evidencia acumulada sugiere que los efectos nefrotóxicos del *p*-cresol, *p*-cresol-sulfato y sus análogos no solo comprometen la función renal, sino que también podrían contribuir indirectamente a la disfunción sistémica y neurológica observada en el TEA, al interferir con los procesos de detoxificación, metabolismo energético y regulación inmune.

#### 4.3.3 Efectos hepáticos. Interferencia con rutas de detoxificación hepáticas

El *p*-cresol y sus derivados ejercen efectos hepatotóxicos relevantes que se manifiestan principalmente a través de la alteración de la **función mitocondrial hepática** y del **metabolismo oxidativo**. Se ha demostrado que interfieren con la **respiración mitocondrial asociada a NADH y succinato**, componentes directos e indirectos de la cadena de transporte de electrones, lo que puede desencadenar una disfunción mitocondrial acompañada de respuesta inflamatoria en el hígado. Este estudio sugiere que esta disfunción podría deberse al incremento en la masa mitocondrial o a una activación anómala de la fosfolipasa A2, enzima implicada en el metabolismo de ácidos grasos, lo que conlleva alteraciones en la homeostasis lipídica hepática (185). Además, el *p*-cresol puede sufrir una oxidación de su cadena lateral para dar lugar a compuestos secundarios como el ácido *para*-hidroxibenzoico, o convertirse en quinonas altamente reactivas mediante rutas metabólicas alternativas gracias a las enzimas hepáticas del sistema citocromo P450. Estas quinonas presentan una elevada afinidad por grupos nucleofílicos, particularmente los grupos tiol presentes en el glutatión, proteínas y ácidos nucleicos. En condiciones fisiológicas normales, el glutatión actúa como principal sistema de defensa antioxidante celular, neutralizando estas especies reactivas. Sin embargo, cuando los niveles de glutatión son insuficientes, estas quinonas forman aductos covalentes tóxicos con proteínas de membrana, lo que contribuye al daño hepático y a la disfunción celular (185). Cuando alcanzan otros tejidos, como el SNC donde se ha planteado su implicación en procesos de neurotoxicidad y neuroinflamación, particularmente si se acumulan en concentraciones elevadas (158,185). La **sobrecarga del sistema de desintoxicación hepático** puede amplificar el estrés oxidativo sistémico, contribuir a la **neuroinflamación**, y exacerbar procesos patológicos en el contexto del TEA y otras enfermedades crónicas.

#### 4.3.4 Efectos gastrointestinales

Aproximadamente el **40% de los niños con TEA** presentan algún tipo de **trastorno gastrointestinal** crónico, siendo el más común el **estreñimiento funcional** (186). Diversos estudios han identificado niveles elevados de *p*-cresol-sulfato en pacientes con TEA, correlacionados con disminución de la motilidad intestinal y presencia de estreñimiento crónico (163,187).

El *p*-cresol parece contribuir a estos síntomas mediante múltiples mecanismos, entre ellos sus **efectos antimicrobianos**. Este compuesto actúa como un antibiótico endógeno, inhibe selectivamente a bacterias Gram-negativas y elimina bacterias productoras de butirato en el colon (166). Por otro lado, las bacterias productoras de *p*-cresol como *C. difficile* muestran alta **tolerancia** al compuesto, lo que les otorga una ventaja ecológica competitiva y favorece su persistencia e infecciones recurrentes (165).

A nivel celular, la presencia de *p*-cresol en el colon ha demostrado inducir **genotoxicidad** en células epiteliales intestinales, promoviendo mutaciones potencialmente asociadas con procesos carcinogénicos (178). Además, este compuesto puede afectar la expresión y función de proteínas de unión estrecha, como claudinas y ocludinas, comprometiendo la integridad de la barrera intestinal y aumentando su permeabilidad. Este fenómeno de **intestino permeable** ha sido propuesto como un factor relevante en la fisiopatología del TEA, al facilitar el paso de metabolitos tóxicos y antígenos microbianos hacia la circulación sistémica, exacerbando la **neuroinflamación** y la **disfunción inmunológica** (188–190).

#### 4.3.5 Efectos neurotóxicos

La evidencia actual sugiere que muchos de **los efectos neurotóxicos** asociados al ***p*-cresol** y ***p*-cresol-sulfato** no solo resultan de su acción directa sobre el SNC, sino también de su impacto sobre otros sistemas fisiológicos clave. La **disfunción mitocondrial**, el **daño hepático**, el **deterioro de la barrera intestinal** y la **alteración de la función renal**, ya discutidos, **contribuyen de forma indirecta a un entorno neuroinflamatorio y neurotóxico**, facilitando la entrada y acumulación de estas toxinas en el SNC. Estas interacciones sistémicas, generan un escenario propicio para la alteración del

neurodesarrollo, el desequilibrio redox cerebral y la neuroinflamación, procesos que se han relacionado con los síntomas TEA y otras patologías neurológicas.

Varios estudios en modelos murinos (175,182,191,192) han evidenciado que la exposición al *p*-cresol puede inducir alteraciones conductuales y neurobiológicas compatibles con los síntomas TEA. Entre los cambios más representativos se encuentran **el aumento de la actividad locomotora, comportamientos de ansiedad, deterioro de las habilidades sociales, pérdida neuronal y neuroinflamación** (175,182,191,192). Estos efectos se han asociado, en gran medida, con disfunciones en el hipocampo, una región clave para la memoria, la socialización y el procesamiento emocional (175,182).

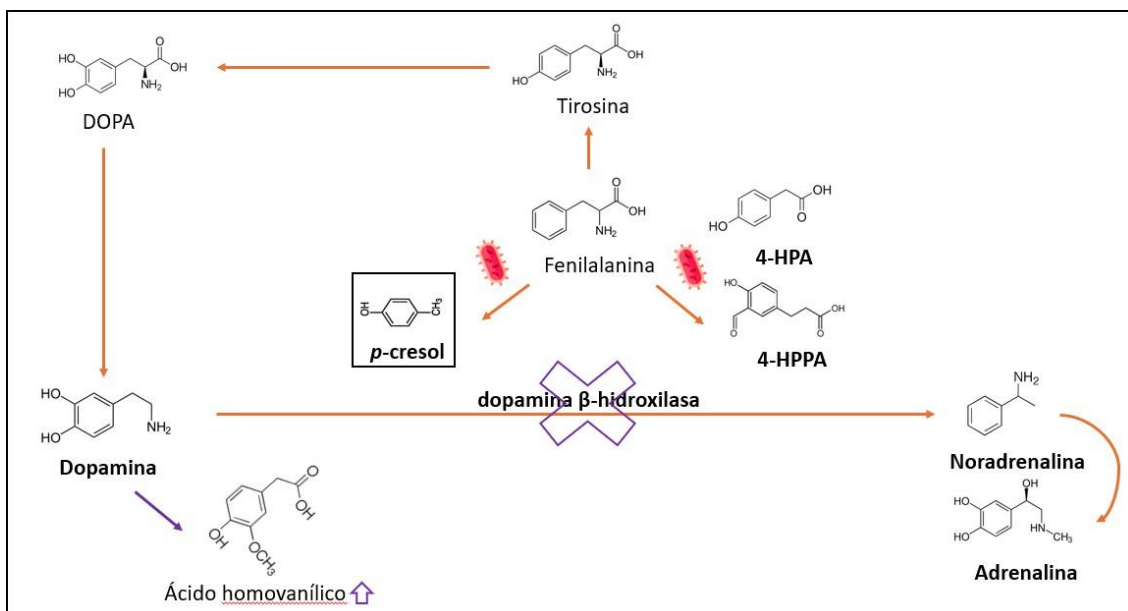
A nivel molecular, se han identificado **alteraciones en la expresión de genes implicados en la neurotransmisión y el estrés oxidativo**. Uno de ellos es el receptor NMDA, receptor de glutamato, fundamental para la plasticidad sináptica, la maduración neuronal y la transmisión glutamatérgica (193). La sobreestimulación de este receptor puede provocar excitotoxicidad, un mecanismo patológico que conduce a daño neuronal. En modelos animales y estudios *post mortem* en individuos con TEA, se han descrito modificaciones en la expresión de una subunidad del receptor, lo que apoya su implicación en la fisiopatología del trastorno. Asimismo, se ha observado una disrupción en la vía KEAP1-NRF2, esencial para la respuesta antioxidante celular. La proteína asociada a Kelch ECH 1 (KEAP1) es una proteína que actúa inhibiendo el factor de transcripción nuclear eritroide (NRF2), el cual regula genes antioxidantes de defensa. Bajo condiciones de estrés oxidativo, una alteración en esta vía puede agravar la disfunción mitocondrial y aumentar la vulnerabilidad neuronal al daño oxidativo (182).

Desde el punto de vista celular, el *p*-cresol ha mostrado **efectos neurotóxicos directos sobre neuronas hipocampales**. Se ha registrado un incremento de marcadores apoptóticos y un aumento de la neuroinflamación en esta región tras la exposición al compuesto. Además, en líneas celulares neuronales (Na2 y PC-12), se ha documentado una reducción dosis-dependiente en el número y longitud de las dendritas primarias y secundarias, así como una disminución en la arborización dendrítica, lo que indica un impacto negativo sobre la morfología y la conectividad neuronal (175).

Un estudio exploró el efecto de bajas concentraciones de *p*-cresol, reportando una posible respuesta adaptativa, con **potenciación de la diferenciación neuronal** mediada por el factor neurotrófico derivado del cerebro, junto con la modulación de la expresión de neurofilamentos. Este efecto se interpretó como una respuesta compensatoria frente a un estrés oxidativo leve inducido por el *p*-cresol, mediada por vías opioidérgicas y parcialmente revertida por oxitocina. Aun así, esta remodelación estructural puede comprometer la maduración sináptica y la funcionalidad de redes neuronales (193).

Además, se ha documentado que la acumulación cerebral de *p*-cresol-sulfato, junto con otras toxinas urémicas como el indol sulfato y el amoníaco, puede contribuir al desarrollo de encefalopatías y disfunciones neurológicas más amplias, exacerbando los efectos deletéreos sobre el SNC (194,195).

Por último, desde una perspectiva neuroquímica, estos compuestos pueden inhibir la actividad de la **dopamina  $\beta$ -hidroxilasa**, enzima responsable de convertir dopamina en noradrenalina. Esta inhibición favorece un exceso de dopamina y de sus metabolitos, como el ácido homovanílico (196), lo que alteraría la síntesis y el equilibrio de las catecolaminas cerebrales (Figura 6) (197).



**Figura 6.** Inhibición de la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa por el *p*-cresol y los compuestos intermediarios de su síntesis. Adaptada de Saha *et al.* 2023 (196).

#### 4.3.6 Efectos inmunológicos

Aunque la capacidad inmunosupresora del *p*-cresol ha sido objeto de debate, dado que este compuesto es rápidamente metabolizado por el organismo, diversos estudios sugieren que puede ejercer efectos directos sobre el sistema inmunológico intestinal, en especial sobre componentes como el tejido linfoide asociado al intestino y las placas de Peyer. En este contexto, se ha descrito una **reducción en la funcionalidad de los leucocitos**, afectando procesos esenciales como la fagocitosis y la producción de citocinas proinflamatorias (160).

La fagocitosis, llevada a cabo principalmente por macrófagos y neutrófilos, representa un mecanismo esencial para la eliminación de patógenos y restos celulares. Asimismo, la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos, como TNF- $\alpha$  o IL-6, es crucial para la activación y modulación del entorno inmunológico. Paralelamente, la expresión de moléculas de adhesión endotelial, como la Molécula de Adhesión Intercelular 1 y Molécula de Adhesión Celular Vascolar 1, inducidas por señales inmunológicas, permite el reclutamiento y tráfico de leucocitos hacia los tejidos afectados, facilitando así una respuesta localizada y eficaz. Estudios *in vitro* han demostrado que el *p*-cresol puede interferir con cada uno de estos procesos, debilitando la respuesta inmunitaria (173,198,199).

El ***p*-cresol-sulfato**, por su parte, muestra un **comportamiento dosis-dependiente**. A bajas concentraciones (10-25  $\mu\text{g/mL}$ ) estimula la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno, mientras que a concentraciones intermedias (50  $\mu\text{g/mL}$ ), reduce la capacidad de respuesta inmune frente a endotoxinas bacterianas como los lipopolisacáridos. Finalmente, a altas concentraciones (250-1000  $\mu\text{M}$ ), suprime la respuesta inmune mediada por la sobreestimulación de interleucina-10, una citoquina antiinflamatoria que inhibe la síntesis de interleucina-12 y bloquea la respuesta adaptativa Th1 (160).

Estudios recientes han implicado al ***p*-cresol-sulfato** en la regulación inmune cerebral a través de su **interacción con la microglía**. En modelos *in vitro*, se ha demostrado que inhibe la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacáridos mediante la reducción de los niveles de metaloproteinasas de membrana involucradas

en el corte de proteínas transmembrana, incluidas citocinas y receptores clave en la señalización inflamatoria. Esta inhibición conlleva una menor liberación de citocinas proinflamatorias y un aumento de la actividad fagocítica microglial. Tales alteraciones en la actividad de estas enzimas se han asociado con una disfunción sináptica y una conectividad cerebral anómala en individuos con TEA. De hecho, estudios *in vivo* han detectado niveles elevados de *p*-cresol-sulfato y su metabolito conjugado en sangre, acompañados de una desregulación de estas enzimas (200).

#### 4.4 Implicación del *p*-cresol y *p*-cresol-sulfato en otras patologías relacionadas con TEA

Los sujetos con TEA presentan una mayor prevalencia de enfermedades concurrentes en comparación con la población general. Entre las comorbilidades más frecuentes se encuentran la **enfermedad de Parkinson** y la **epilepsia**. La prevalencia de enfermedad de Parkinson en adultos jóvenes con TEA se ha estimado entre el **40% y el 80%** (201) lo que representa una proporción significativamente elevada. Esta asociación podría explicarse, al menos en parte, por los **altos niveles de *p*-cresol** observados tanto en pacientes con TEA como con enfermedad de Parkinson. Además, se ha descrito un **aumento de la actividad de las monoamino oxidasas** en pacientes parkinsonianos, lo cual podría influir en el metabolismo de neurotransmisores clave como la dopamina (195). Es relevante destacar que los pacientes con Parkinson también presentan con frecuencia trastornos gastrointestinales, especialmente **estreñimiento crónico**, que suelen preceder a la aparición de los síntomas neurológicos. Esta coincidencia refuerza la hipótesis de que la microbiota podría desempeñar un papel en la fisiopatología de ambas condiciones (202).

La **epilepsia** es también frecuente en personas con TEA, particularmente en aquellos casos que cursan con **discapacidad intelectual** (203). Como se ha descrito anteriormente, el *p*-cresol puede inhibir la conversión de dopamina a noradrenalina al interferir con la enzima dopamina β-hidroxilasa, alterando así el equilibrio catecolaminérgico cerebral. Asimismo, puede afectar el metabolismo del glutamato. Estudios en modelos murinos (193) y humanos (203) han propuesto que los **niveles elevados de *p*-cresol** podrían contribuir a la aparición de **convulsiones** en personas con TEA y epilepsia. En modelos animales, la exposición al *p*-cresol ha inducido episodios

convulsivos relacionados con **alteraciones en la expresión de las subunidades GluN2A y GluN2B** de los receptores NMDA. Estos cambios se han observado en el **hipocampo** y el **núcleo accumbens**, regiones clave para la regulación de la conducta y la excitabilidad sináptica. La disrupción en el equilibrio de estas subunidades puede alterar la homeostasis glutamatérgica, favoreciendo un estado de **hiperexcitabilidad neuronal** que incrementa el riesgo de crisis convulsivas (193).

---

## 5. MICROBIOTA Y NEURODESARROLLO

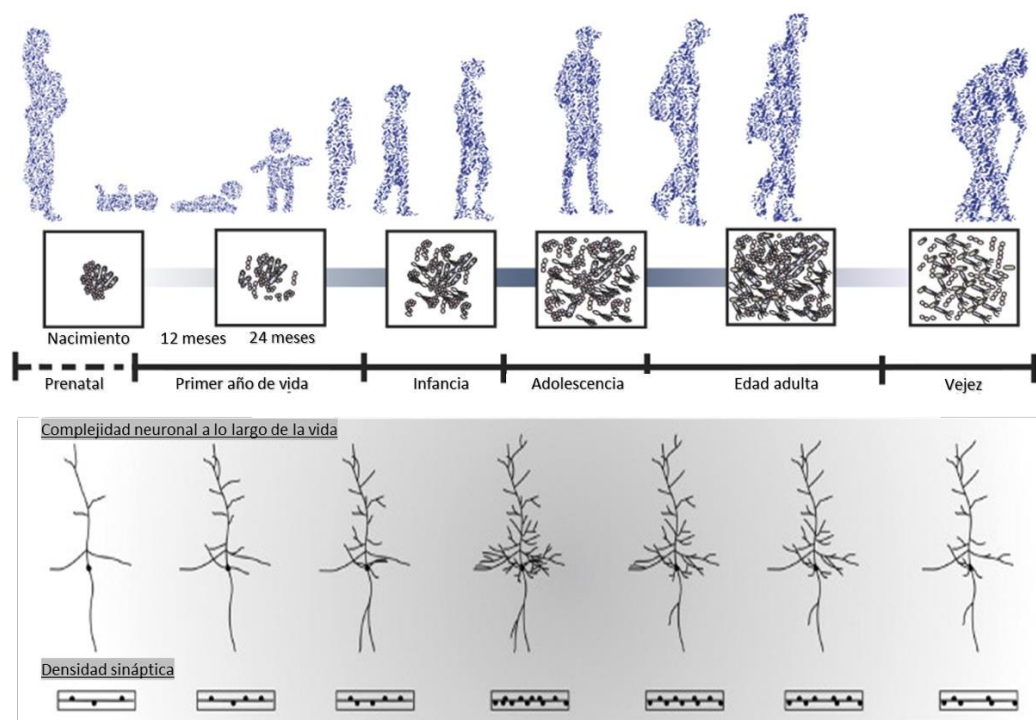
Como se ha señalado, la microbiota ha acompañado al ser humano a lo largo de su historia evolutiva, constituyéndose como un ecosistema dinámico e integral para la salud. Este fluctúa constantemente a lo largo de la vida. Aunque en un mismo individuo pueden observarse variaciones diarias en su composición microbiana (204), estas alteraciones son especialmente notorias cuando se consideran desde una perspectiva del desarrollo vital.

En las distintas fases de la vida, la microbiota intestinal atraviesa transiciones críticas que la hacen especialmente susceptible a influencias internas y externas. Se han identificado tres periodos clave de transformación o **“ventanas sensibles”** en los que cualquier disrupción microbiana puede tener repercusiones relevantes: la **infancia**, la **adolescencia** y la **vejez**. Desde una perspectiva neurocientífica, estos periodos son también fases del desarrollo del SNC caracterizados por una mayor plasticidad y, al mismo tiempo, mayor vulnerabilidad a influencias ambientales (**Figura 7**) (205). Procesos fundamentales como la neurogénesis, la sinaptogénesis y la poda sináptica están programados genéticamente y se manifiestan en marcos temporales específicos, coincidiendo con estas ventanas. Aplicados originalmente al desarrollo de diferentes sistemas sensoriales, hoy se sabe que estos periodos también afectan funciones cognitivas superiores, como el lenguaje y la cognición (205,206).

Comprender estas coincidencias requiere primero caracterizar los principios que gobiernan el neurodesarrollo (207). Este proceso se sustenta en una **estructura jerárquica** en la que funciones básicas como el control motor se desarrollan primero y constituyen la base para funciones más complejas, como el lenguaje. Así, las

capacidades emergentes dependen de las anteriores, lo que subraya la secuencialidad y dependencia del desarrollo.

Sin embargo, esta progresión no es lineal ni predecible: pequeños cambios en fases tempranas pueden generar efectos amplificados o atenuados posteriormente. Este principio de **no linealidad** refleja una propiedad propia de sistemas complejos, en los cuales surgen propiedades nuevas o emergentes que no pueden explicarse únicamente por la suma de componentes previos. Es decir, el desarrollo conlleva transformaciones cualitativas, no meramente acumulativas.



**Figura 7. Microbiota y neurodesarrollo a lo largo de la vida.** Gráfico cronológico que refleja procesos neuronales concomitantes con cambios en la diversidad microbiana desde el nacimiento hasta la vejez, incluyendo la infancia, niñez, adolescencia y edad adulta. La profundidad de la barra azul representa el período de tiempo en el que los procesos indicados son más intensos. Adaptada de Borre *et al.* 2014 (96).

El neurodesarrollo es un proceso **ordenado, secuencial y orientado**, con una **dirección definida** hacia metas funcionales específicas. Se espera una progresión relativamente paralela entre las diferentes áreas funcionales (motora, cognitiva,

lingüística, social-emocional); la disociación entre estas dimensiones puede señalar alteraciones del desarrollo, como ocurre en los trastornos del neurodesarrollo.

Otra característica fundamental es su **irreversibilidad relativa**: si bien existen mecanismos compensatorios, una vez alcanzado un determinado nivel de organización, no suele revertirse completamente. Asimismo, el neurodesarrollo está marcado por principios de **epigénesis** y **emergencia**, lo que implica que no está completamente predeterminado por los genes, sino que surge como producto de la interacción dinámica entre factores biológicos, ambientales y experienciales. En este sentido, el organismo "se construye a sí mismo" de forma progresiva, generando nuevas formas de organización a medida que se desarrolla.

### 5.1 Primeros años de vida: desarrollo neurobiológico y establecimiento de la microbiota

El desarrollo cerebro humano atraviesa etapas críticas que se extienden desde el periodo embrionario hasta la infancia temprana (208). Durante este intervalo, especialmente en los primeros años de vida, el sistema nervioso experimenta una notable expansión estructural y funcional. En el primer año, el tamaño de las neuronas aumenta significativamente, impulsado por el crecimiento del citoplasma, la proliferación glial, la sinaptogénesis y la vascularización cerebral. A los seis años, el cerebro ha alcanzado aproximadamente el 90% de su volumen adulto, aunque los procesos de maduración, como el remodelado de la sustancia gris y blanca, continúan hasta la tercera década de la vida (209). Durante esta etapa temprana, el desarrollo cerebral se caracteriza por la formación de nuevas conexiones sinápticas, que posteriormente serán refinadas a través de fenómenos como la poda sináptica y la apoptosis. Asimismo, se lleva a cabo la mielinización progresiva de los axones, lo que mejora la eficiencia de la transmisión neuronal (208). Estos procesos, enmarcados dentro de la neuroplasticidad, permiten la adquisición gradual de funciones específicas. Inicialmente se desarrollan capacidades sensoriales, seguidas por el lenguaje, y más tarde se consolidan habilidades cognitivas complejas como el pensamiento abstracto o la cognición social, fundamentales para la comprensión del entorno y las relaciones interpersonales (208).

En este periodo de alta sensibilidad al entorno, la microbiota intestinal también comienza a establecerse y desempeña un papel clave en la modulación del desarrollo cerebral. Existen evidencias experimentales que sustentan esta relación; por ejemplo, un estudio *in vivo* demostró que la presencia de microbiota intestinal reduce la permeabilidad de la barrera hematoencefálica e incrementa la expresión de proteínas de unión estrecha. La comunicación bidireccional entre el SNC y la microbiota intestinal se inicia durante la gestación y persiste a lo largo de la vida (210).

Como se señaló anteriormente, los factores prenatales desempeñan un papel determinante en la adquisición de la diversidad microbiana inicial. Sin embargo, la cronología exacta del comienzo de la colonización microbiana del tracto gastrointestinal es aún objeto de debate. Algunos estudios han propuesto la existencia de una microbiota intrauterina, postulando la colonización del útero y la placenta (211–213). No obstante, estas afirmaciones han sido posteriormente cuestionadas por atribuirse a contaminación ambiental o técnica debido a la ausencia de controles adecuados, defendiendo que estos órganos serían, en condiciones normales, estériles (214–216). Con las técnicas de secuenciación actuales, no es posible confirmar de manera concluyente la presencia de microbiota placentaria, ya que la mayoría de las secuencias obtenidas pueden explicarse por múltiples fuentes de contaminación (217).

La adquisición de las primeras especies que colonizan nuestro intestino va a influir en la composición de la microbiota a largo plazo. En este sentido, la **vía de nacimiento** constituye un factor determinante. En partos vaginales, el neonato entra en contacto con la microbiota vaginal y perianal materna, favoreciendo la transmisión vertical de bacterias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* (218). En contraste, el nacimiento por cesárea expone al recién nacido principalmente a la microbiota de la piel y del entorno hospitalario, con una mayor prevalencia de *Staphylococcus* spp.(219) y una reducción de bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (220). Diversos estudios han asociado este procedimiento con una disminución de la diversidad y riqueza microbiana (218,221,222), así como con un mayor riesgo de infecciones neonatales por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (219) o *C. difficile* (220). Ante estas implicaciones, se han propuesto estrategias como la **siembra vaginal** o la suplementación con **probióticos y prebióticos** para mitigar los posibles efectos adversos

del nacimiento por cesárea. Sin embargo, los resultados en términos de recuperación de la microbiota y sus efectos a largo plazo sobre la salud infantil aún no son concluyentes.

En términos generales, la microbiota neonatal se caracteriza por una dominancia de *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae* y *Clostridiaceae*, con niveles reducidos de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* (223,224). A medida que el niño crece, especialmente durante los primeros tres años de vida, la introducción progresiva de alimentos sólidos propicia una transición hacia un ecosistema intestinal más complejo y diverso, característico de la microbiota adulta (225). Esta adaptación es clave no solo para la maduración del sistema inmune, sino también para la prevención de trastornos inflamatorios y del neurodesarrollo.

No obstante, conviene matizar que, incluso en edades escolares (6–12 años), la microbiota intestinal de los niños continúa siendo funcional y composicionalmente distinta a la del adulto. Esta se encuentra adaptada a las necesidades metabólicas propias de su etapa de crecimiento y desarrollo, incluyendo rutas como la síntesis de folato y de vitaminas, así como funciones inmunomoduladoras (225).

## 5.2 Adolescencia

La adolescencia es una etapa de transición caracterizada por una intensa transformación biológica, psicológica y social. Durante este periodo, se producen cambios acelerados tanto en el cuerpo como en el cerebro, impulsados en gran parte por las fluctuaciones hormonales propias de la pubertad. Desde el punto de vista cerebral, la adolescencia se acompaña de una profunda remodelación estructural y funcional, que incluye procesos de poda sináptica, mielinización, cambios volumétricos en regiones clave y reconfiguración de la conectividad funcional (226). Estas modificaciones estructurales contribuyen al desarrollo de funciones cognitivas avanzadas, aunque también aumentan la vulnerabilidad a trastornos emocionales y psiquiátricos (227).

Este periodo coincide con el aumento de la independencia del individuo, lo que se traduce en cambios significativos en los hábitos de vida, como las rutinas alimenticias, el patrón de sueño y, en algunos casos, las primeras exposiciones al consumo de alcohol

y otras sustancias psicoactivas. Además, la adolescencia marca el inicio de un mayor riesgo para la aparición de trastornos psiquiátricos, entre ellos la depresión, cuya prevalencia se incrementa significativamente durante estos años (227). Por tanto, la adolescencia puede considerarse un periodo crítico de transformación, en el que resulta pertinente examinar el papel modulador de la microbiota intestinal.

Aunque la literatura sobre microbiota en población adolescente (12–18 años) es limitada, se ha observado que la composición microbiana en esta etapa muestra una transición gradual hacia el perfil adulto, aunque mantiene ciertas características propias. En concreto, se ha descrito una mayor abundancia de géneros como *Bifidobacterium* y *Clostridium*, junto con una disminución relativa de *Prevotella* y *Sutterella* (228). Este perfil refleja no solo la maduración biológica, sino también la influencia de factores externos como la dieta, el estilo de vida o el uso de antibióticos.

Los hábitos alimenticios adquiridos durante la adolescencia son determinantes en la configuración de la microbiota y pueden tener efectos prolongados en la salud. Dietas desequilibradas, pobres en fibra y ricas en azúcares y grasas procesadas, se asocian con una menor diversidad microbiana, lo que podría predisponer al desarrollo de enfermedades metabólicas e inflamatorias en la vida adulta (228).

Por otro lado, el uso prolongado de antibióticos durante la adolescencia también puede inducir alteraciones en el ecosistema intestinal. Estudios *in vivo* han mostrado que estos desequilibrios del microbioma se asocian a alteraciones del comportamiento, incremento de la ansiedad, y deterioro de funciones cognitivas en la edad adulta. Estos efectos coinciden con una disminución en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro, así como de oxitocina, vasopresina y de metabolitos clave del triptófano, todos ellos relevantes en la regulación del estado de ánimo, la plasticidad sináptica y el comportamiento social (229).

Si bien estos hallazgos deben interpretarse con cautela, ponen de manifiesto la importancia de los factores ambientales en la conformación de la microbiota durante este periodo sensible del desarrollo. La adolescencia, por tanto, no solo representa una etapa de vulnerabilidad sino también una ventana de oportunidad para la intervención

preventiva a través de estrategias dirigidas al mantenimiento de una microbiota saludable.

### 5.3 Edad adulta y envejecimiento

A medida que se alcanza la edad adulta, la microbiota intestinal tiende a estabilizarse y diversificarse. En individuos sanos, es decir, en ausencia de enfermedades crónicas y con una adecuada calidad de vida, la composición microbiana intestinal es específica y relativamente estable a lo largo del tiempo. Esta microbiota madura puede resistir el impacto de ciertos factores ambientales adversos, como el uso de antibióticos o el estrés, y es capaz de recuperarse una vez cesa la agresión. De forma paralela a esta estabilización microbiana, el cerebro también experimenta un proceso de maduración prolongada durante la edad adulta, en el que se consolidan estructuras y funciones neurocognitivas (96,97).

Aunque la edad adulta no se considera una fase crítica del neurodesarrollo (205), persisten procesos asociados a la neuroplasticidad, lo que sugiere que se conserva una cierta capacidad de adaptación a lo largo de la vida (96,97). No obstante, alteraciones en la microbiota intestinal durante este periodo pueden influir negativamente en el funcionamiento cerebral y en el comportamiento, lo que posiciona a la microbiota como un factor clave en la promoción y mantenimiento de la salud mental durante el envejecimiento. Por tanto, conservar una microbiota intestinal diversa y funcional puede representar una estrategia preventiva frente al deterioro neurológico asociado a la edad.

El envejecimiento es un proceso progresivo caracterizado por el declive funcional de múltiples sistemas fisiológicos y la pérdida de homeostasis. Entre los rasgos biológicos que definen este proceso se incluyen la inestabilidad genómica, el acortamiento de telómeros, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de proteostasis, la desactivación de la macroautofagia, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, la alteración de la comunicación intercelular, el agotamiento de las células madre, la alteración de la comunicación intercelular, la inflamación crónica y las alteraciones del microbioma (230).

En particular, se ha observado que tanto la **diversidad** como la **estabilidad** de la microbiota **disminuyen con la edad**, y estos cambios se correlacionan estrechamente con el estado de salud general del individuo (231). El sistema inmunológico también se ve afectado, en lo que se conoce como inmunosenescencia. Todo ello sumado al aumento de comorbilidades y al uso frecuente de medicamentos, contribuye a desestabilizar el ecosistema intestinal. En cuanto a la composición bacteriana, se ha documentado una **reducción en la abundancia de bacterias ácido-lácticas** beneficiosas, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (232).

Uno de los estudios más relevantes en este campo es el proyecto ELDERMET, que examinó a una población anciana y reveló cómo los cambios relacionados con la edad en la microbiota intestinal se asociaban con diversos indicadores de salud funcional, como la fragilidad, el estado cognitivo, los síntomas depresivos y los niveles de marcadores inflamatorios. Una de las conclusiones más destacadas fue la relación positiva entre una mayor diversidad dietética, una microbiota intestinal más rica y un mejor perfil de salud global, incluyendo menor fragilidad y mejor funcionalidad física y mental (231).

En resumen, el envejecimiento representa un periodo de vulnerabilidad para la microbiota y el sistema nervioso. Las intervenciones dietéticas, la reducción del uso innecesario de antibióticos y la promoción de hábitos saludables podría ser clave para mitigar el deterioro cognitivo y emocional asociado a la edad avanzada.

---

## 6. ALTERACIONES DE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA EN TEA

### 6.1 Alteraciones de la composición microbiana observadas en modelos animales

El uso de modelos animales en la investigación ha demostrado ser fundamental para desentrañar los mecanismos biológicos implicados en la etiología del TEA. Estos modelos permiten estudiar la implicación de factores genéticos y ambientales, y cómo dichos efectos pueden correlacionarse con hallazgos en humanos. En particular, las alteraciones en la microbiota intestinal observadas en modelos murinos con fenotipos relacionados con el TEA ofrecen resultados relevantes. A continuación, se exponen distintos modelos inducidos por factores de riesgo ambientales. como la exposición

prenatal al ácido valproico, la activación inmunitaria materna, la dieta materna rica en grasas o la administración de *p*-cresol; en modelos idiopáticos (como el ratón *BTBR*) y en modelos con mutaciones genéticas específicas asociadas al autismo (por ejemplo, *Shank3* KO, *NLGN3*R451C, o *EphB6* KO), se ha observado un impacto significativo en la composición y diversidad de la microbiota intestinal (233).

En el **modelo de exposición prenatal al ácido valproico**, un antiepiléptico con efectos conocidos sobre el desarrollo del SNC, se han detectado alteraciones microbianas notables. Por ejemplo, se ha comunicado una disminución de la diversidad microbiana de *Bacteroides*, *Deltaproteobacteria* y *Erysipelotrichales*, junto con un aumento de bacterias del orden *Clostridiales* (234). En ratones macho, se observaron incrementos específicos en *Alistipes*, *Enterorhabdus*, *Mollicutes*, *Lactobacillales* y *Erysipelotrichaceae*, lo que pone de manifiesto una posible influencia del sexo biológico sobre las respuestas microbianas (235). En ratas, la exposición al ácido valproico también condujo a una reducción de la diversidad microbiana, con un aumento de  $\alpha$ -*Proteobacteria*, *Eubacteriaceae*, *Rikenellaceae* y *Staphylococcaceae*, y mayores niveles de *Allobaculum*, *Anaerofustis*, *Proteus* y *Staphylococcus* (182).

En el **modelo de activación inmune de la madre gestante**, se induce una respuesta inflamatoria sistémica que altera el neurodesarrollo de la descendencia. Este modelo ha mostrado daños en la integridad de la barrera intestinal, alteraciones en la diversidad microbiana, así como en los metabolitos séricos similares a los encontrados en individuos con TEA. La descendencia mostró grandes diferencias en la diversidad de *Clostridia* y *Bacteroidia*, una mayor abundancia en las familias de *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae* y *Prevotellaceae*, aunque sin cambios notables en la riqueza global de especies. Algunas cepas específicas dentro de *Lachnospiraceae*, junto con miembros del filo Bacteroidota, podrían estar implicadas en los fenotipos autistas inducidos por activación inmune de la madre (161).

En el **modelo de dieta rica en grasas** que simula una exposición prenatal a las grasas, también se detectó una reducción significativa en la diversidad microbiana. Específicamente, se observaron disminuciones en *Lactobacillus*, *Parabacteroides*,

*Helicobacter* y *Bacteroides uniformis* (236), lo cual sugiere un entorno intestinal empobrecido durante el desarrollo temprano.

Una línea de evidencia particularmente reveladora proviene de **estudios con ratones libres de gérmenes (*germ-free*, GF)**. Estos animales, criados en condiciones totalmente estériles, presentan déficits marcados en el comportamiento social, lo que sugiere que la ausencia de colonización bacteriana durante el desarrollo afecta negativamente el desarrollo neurológico y conductual (237,238). En estudios posteriores, se demostró que la colonización de ratones GF con microbiota fecal de niños con TEA indujo conductas similares y alteró sustancialmente la composición microbiana intestinal de los receptores (239), lo que refuerza el papel causal de la microbiota en la expresión del fenotipo autista.

**El modelo idiopático BTBR**, ampliamente utilizado en estudios de TEA, también presenta alteraciones microbianas relevantes. En estos ratones se ha documentado un aumento de bacterias del clúster XI de *Clostridium* y del filo Bacteroidota, así como una disminución de Bacillota. Además, muestran niveles elevados de *Akkermansia muciniphila*, bacteria clave en el mantenimiento de la capa mucosa intestinal (240). Otros estudios han identificado como taxones relevantes a los géneros *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Sutterella*, *Dehalobacterium* y *Oscillospira*, con diferencias específicas según el sexo del animal (241).

En cuanto a **modelos genéticos**, los ratones ***Shank3* KO**, que reproducen mutaciones asociadas con TEA en humanos, muestran una marcada disminución en miembros de la clase *Bacilli*, el orden *Lactobacillales* y el género *Lactobacillus*. También se han observado descensos en los géneros *Coprococcus*, *Bacteroides*, *Acetobacter*, *Turicibacter* y *Prevotella*, mientras que *Veillonella* se encuentra incrementada (242). De forma similar, **los ratones con mutaciones en el gen *NLGN3***, un alelo de riesgo bien establecido para el TEA (243), presentan alteraciones gastrointestinales destacables. Las variantes *NLGN3R451C*, específicamente, muestran alteraciones en las comunidades microbianas fecales, con un aumento de *Clostridia* y una reducción de bacterias del filo *Candidatus* (233).

El Síndrome de X Frágil, la causa monogénica más común del TEA, se ha modelado eficazmente mediante **ratones *FMR1* KO**. En estos animales se han detectado aumentos en los filos Bacillota, Bacteroidota y Verrucomicrobiota, así como en los géneros *Sutterella* y *Akkermansia*, junto con una disminución de *Prevotella* (244). En otro modelo genético con **duplicación de la región humana 15q11–13**, también se ha descrito una disminución significativa de la diversidad microbiana y del número de unidades taxonómicas operativas (OTU) (245).

Por último, el gen *EphB6*, ubicado en el cromosoma 7q, ha sido propuesto como candidato en la susceptibilidad al TEA. En **ratones *EphB6* KO** se ha reportado una reducción del filo Deferribacterota y, a nivel de género, de *Mucispirillum* (246).

## 6.2 Alteraciones microbianas observadas en pacientes con TEA

Las investigaciones recientes han puesto de manifiesto diferencias significativas en la microbiota de sujetos con TEA frente a la de sujetos neurotípicos (247). Estas diferencias han despertado un notable interés por su potencial uso como biomarcadores diagnósticos y por la posibilidad de identificar nuevas dianas terapéuticas en el abordaje de este trastorno del neurodesarrollo. No obstante, pese a la abundancia de estudios, los hallazgos siguen siendo mayoritariamente inconsistentes y, en muchos casos, contradictorios. Esta falta de consenso se refleja tanto en los estudios individuales como en los metaanálisis realizados en los últimos años, lo que impide establecer un perfil microbiano claro y uniforme asociado al TEA.

Varios factores metodológicos y contextuales pueden contribuir a estas discrepancias. Por un lado, el grueso de la investigación se concentra en China y EE.UU., lo que limita la capacidad de generalizar los hallazgos a otras poblaciones, especialmente si se considera la influencia de factores asociados al microbioma como la dieta, el entorno ambiental, y las prácticas sanitarias, que varían ampliamente entre regiones y pueden afectar significativamente la composición microbiana. Además, muchos estudios presentan tamaños muestrales reducidos y una alta heterogeneidad entre los participantes, incluyendo los rangos de edad. Esta variabilidad se ve acentuada por la escasa homogeneidad en los datos recogidos sobre la historia clínica, como la presencia de comorbilidades gastrointestinales o el uso de probióticos, prebióticos y

dietas específicas, todos ellos factores que pueden modificar sustancialmente la microbiota (171).

A nivel metodológico, la mayoría de los estudios emplean técnicas de secuenciación del gen 16S ADNr para analizar la diversidad bacteriana, centrándose en niveles taxonómicos de filo y género, y reportando los resultados como abundancia relativa o porcentajes. En menor medida, se han aplicado enfoques más complejos como la metagenómica por la técnica de *shotgun*, la PCR o métodos basados en el cultivo (171), lo que también contribuye a la disparidad de resultados.

Hasta la fecha se han publicado cinco metaanálisis que han explorado la relación entre la microbiota y el TEA, arrojando conclusiones dispares. El primero, realizado por **Xu et al. (2019)**, encontró una menor abundancia de géneros como *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Enterococcus* y *E. coli* en niños con TEA, así como una mayor presencia de *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus* y *Clostridium* (248). **Iglesias-Vázquez et al. (2020)**, destacaron una mayor abundancia de filos como Bacteroidetes, Bacillota y Actinobacteria, además de géneros específicos como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides* y *Phascolarctobacterium*, junto con una reducción de *Bifidobacterium* y *Coprococcus* (249). Por otro lado, el estudio de **Andreo-Martínez et al. (2022)** no halló diferencias significativas en la abundancia de los principales filos bacterianos, aunque sí comunicó niveles más bajos de *Bifidobacterium* y *Streptococcus* en los niños con TEA (247).

En 2024, se publicaron dos metaanálisis que volvieron a poner de manifiesto la complejidad del perfil microbiano en este trastorno. En el trabajo de **Lin et al. (250)** señalaron una disminución en *Bifidobacterium* y *Parabacteroides*, con aumento de los géneros *Bacteroides*, *Clostridium* y *Faecalibacterium*. Paralelamente, el trabajo de **Yang et al. (171)** ha sido el que ha integrado el mayor número de estudios hasta la fecha (28), y no solo confirmó alteraciones previamente descritas, sino que también identificó diferencias significativas en géneros menos explorados como *Dorea*, *Catenibacterium* y *Odoribacter*. De forma general, los resultados de Yang et al. mostraron que los niños con TEA presentaban una **mayor abundancia de** *Parabacteroides*, *Anaerostipes*, *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Dorea*, *Phascolarctobacterium*, *Lachnoclostridium*,

*Catenibacterium* y *Collinsella*, mientras que géneros como *Barnesiella*, *Odoribacter*, *Paraprevotella*, *Blautia*, *Turicibacter*, *Lachnospira*, *Pseudomonas*, *Parasutterella*, *Haemophilus* y *Bifidobacterium* se encontraban **reducidos** en comparación con los controles neurotípicos. Es destacable que estas diferencias, en particular las relativas a *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Dorea*, *Phascolarctobacterium*, *Catenibacterium*, *Odoribacter* y *Bifidobacterium*, se mantuvieron estadísticamente significativas incluso tras realizar análisis de sensibilidad excluyendo secuencialmente estudios individuales, lo que otorga una mayor robustez a estos hallazgos (171).

En conjunto, aunque los resultados no permiten establecer aún un perfil microbiano uniforme para el TEA, sí apuntan hacia ciertos géneros bacterianos que podrían estar implicados en su fisiopatología y que merecen ser explorados más profundamente en futuras investigaciones longitudinales y multicéntricas con un mejor control de variables de confusión.

### 6.3 Caracterización de géneros bacterianos estadísticamente significativos

Una vez establecidas las principales alteraciones microbianas observadas en niños con TEA, resulta relevante profundizar en las características funcionales de los géneros bacterianos cuya abundancia difiere significativamente entre esta población y los niños neurotípicos. Esta revisión permite contextualizar las posibles implicaciones fisiopatológicas de dichas alteraciones, considerando la evidencia actual.

***Faecalibacterium***, es un género reconocido por su capacidad de producir butirato, un AGCC fundamental para la homeostasis intestinal y la integridad de la barrera epitelial. Estudios recientes han sugerido que este género podría estar implicado en la fisiología intestinal y también en procesos relacionados con el neurodesarrollo, incluyendo los síntomas nucleares del autismo (251). Además, *Faecalibacterium* ha sido asociado con la regulación de genes que modulan la expresión de IFN- $\gamma$ , una citoquina cuya sobreexpresión durante el desarrollo prenatal se ha vinculado con un mayor riesgo de TEA (252). También se ha propuesto un mecanismo indirecto de influencia sobre el neurodesarrollo mediante la modulación del eje MIC (253).

***Clostridium*** es un género esporulado que se caracteriza por su capacidad de liberar toxinas y metabolitos proinflamatorios que pueden atravesar la barrera intestinal y alcanzar tejidos distantes, como el cerebro, a través de la circulación sistémica. Algunos compuestos derivados de *Clostridiales* se han asociado a síntomas gastrointestinales y comportamientos repetitivos característicos del TEA (254). Se ha sugerido que la capacidad de formar esporas podría contribuir a la recurrencia de síntomas en esta población (83,255).

***Phascolarctobacterium***, perteneciente al filo Bacillota, ha sido detectado en niveles alterados en individuos con TEA, aunque su papel fisiológico sigue siendo poco comprendido. Algunos estudios preliminares lo relacionan con la producción de ácidos grasos de cadena corta y la modulación del metabolismo energético, aspectos relevantes en la función cerebral y gastrointestinal (256).

***Bifidobacterium*** es una bacteria ácido-láctica ampliamente reconocida por sus propiedades probióticas (257). Es una de las primeras especies que colonizan el intestino neonatal, y su baja abundancia ha sido consistentemente reportada en TEA (258). Participa en la producción de GABA (259), un neurotransmisor inhibitorio cuya relación con el metabolismo del glutamato, principal neurotransmisor estimulador, es crucial en el equilibrio neuroquímico. En niños con TEA, se han observado niveles bajos de glutamato correlacionados con mayor gravedad de síntomas como ansiedad y alteraciones conductuales (111). En modelos animales, la especie *B. pseudocatenulatum* ha demostrado capacidad para modular el eje HPA, reduciendo los niveles de dopamina y adrenalina, y ejerciendo efectos antiinflamatorios (260).

***Streptococcus***, comúnmente vinculado con procesos infecciosos, ha sido hallado en menor abundancia en población TEA. Este hallazgo permite cuestionar la hipótesis de que infecciones por *Streptococcus pyogenes* (grupo A), vinculadas al síndrome PANDAS, tengan un papel determinante en el desarrollo del TEA (258). Además, *Streptococcus* puede producir lactato y serotonina (257) aunque su reducción contrasta con los elevados niveles de lactato observados en algunos pacientes con TEA. Este aparente conflicto podría explicarse por el incremento de la glucólisis aeróbica como consecuencia de disfunciones mitocondriales en TEA, fenómeno propuesto como parte

de su fisiopatología (261), o por una mayor presencia de *Lactobacillus*, también productor de lactato *Lactobacillus* en TEA (248,249).

El género *Dorea* se ha asociado a efectos inflamatorios por estimular la liberación de TNF- $\alpha$  (171). Sin embargo, otros estudios sugieren su capacidad para aliviar las respuestas alérgicas inducidas por la tropomiosina (262).

*Catenibacterium* es un género cuya abundancia parece estar influida por variables sociodemográficas como nacionalidad, raza/etnia y estatus socioeconómico (171), lo cual podría explicar parte de las discrepancias observadas entre estudios.

Por último, *Odoribacter* ha sido vinculado con la regulación del metabolismo de neurotransmisores clave como la serotonina y el glutamato (263) además de participar en la producción de metabolitos con potencial impacto negativo sobre la sintomatología del TEA (171).

#### 6.4 Reflexiones sobre la interpretación y abordaje de la composición microbiana en el TEA

Durante las últimas décadas, una gran parte de la investigación sobre el microbioma en el TEA se ha centrado en cuantificar las abundancias relativas de las poblaciones microbianas intestinales, con la esperanza de identificar alteraciones específicas que pudieran apoyar una etiología microbiana del trastorno. Sin embargo, estos esfuerzos han tenido un éxito limitado, en parte debido a una visión reduccionista heredada de concepciones más antiguas: la tendencia a categorizar las bacterias como “buenas” o “malas”, asociando las primeras con beneficios para la salud y las segundas con efectos negativos o incluso patológicos.

Los avances en microbioma han demostrado que esta dicotomía simplista no refleja la complejidad real del ecosistema intestinal. Los microorganismos comensales, que en condiciones de equilibrio contribuyen al mantenimiento de la homeostasis, pueden también ejercer efectos nocivos en contextos de disbiosis. En un entorno intestinal alterado, estos mismos comensales pueden adquirir características patógenas, participar en la transferencia horizontal de genes y activar respuestas inmunológicas, neurológicas y metabólicas con repercusiones a nivel del SNC. Así, la

contribución de la microbiota no puede entenderse de forma aislada, sino como parte de un sistema dinámico cuya alteración puede repercutir en múltiples niveles del organismo, incluyendo el sistema inmune, el sistema nervioso autónomo, e incluyendo la producción de metabolitos bioactivos.

En este sentido, resulta fundamental interpretar los hallazgos sobre la microbiota intestinal en TEA con una mirada crítica y contextualizada. No basta con promover el crecimiento general de bacterias consideradas beneficiosas mediante la suplementación probiótica estándar. Sin un conocimiento profundo de los desequilibrios específicos que caracterizan a esta población, esta estrategia podría ser no solo ineficaz, sino incluso contraproducente. Una intervención verdaderamente eficaz debería estar basada en un enfoque personalizado, dirigido a corregir las alteraciones particulares del ecosistema intestinal que se presentan en los individuos con TEA.

Esta aproximación exige identificar qué cepas microbianas se encuentran disminuidas o ausentes en la microbiota intestinal de estas personas y diseñar estrategias de reposición selectiva. Solo mediante este abordaje más preciso y adaptado será posible restablecer un equilibrio funcional que favorezca no solo la salud intestinal, sino también la inmunomodulación y, potencialmente, una mejora del bienestar general.

No obstante, alcanzar este objetivo requiere aún de una investigación más profunda que permita desentrañar las complejas interacciones entre la microbiota y la condición TEA, y que identifique las combinaciones probióticas más adecuadas y eficaces para esta población.





# Hipótesis general



## HIPÓTESIS GENERAL

En los últimos años las tecnologías “ómicas” han aumentado considerablemente el conocimiento del ecosistema microbiano humano, permitiendo una caracterización detallada y precisa de las comunidades que lo conforman. Esta nueva perspectiva ha impulsado el estudio de su contribución en numerosas patologías, al tiempo que ha originado oportunidades para desarrollar intervenciones terapéuticas basadas en la modulación dirigida de la microbiota. La hipótesis de partida de esta tesis es que la microbiota intestinal contribuye a la fisiopatología del TEA con una ventana de actuación sobre la neurogénesis en los primeros cuatro años de vida. Las intervenciones dirigidas a modular la microbiota podrían constituir un nuevo abordaje terapéutico en esta patología que genera una carga significativa en los sistemas sanitarios y sociales, e impacta tanto en la calidad de vida de los afectados y de sus familias.

Los objetivos se detallan en cada uno de los tres capítulos que incluye esta tesis, y están centrados en demostrar que la microbiota contribuye a la enfermedad, que es necesario disponer de biomarcadores para su diagnóstico precoz y que la modulación de la microbiota podría ser una alternativa terapéutica.



# Capítulo 1.

Efectos neurobiológicos del  
microbioma artista:

una aproximación *in vivo* en  
*Drosophila melanogaster*

## CAPÍTULO I: EFECTOS NEUROBIOLÓGICOS DEL MICROBIOMA AUTISTA: una aproximación *in vivo* en *Drosophila melanogaster*

### I. ANTECEDENTES

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es un modelo experimental ampliamente utilizado en estudios biomédicos que, en las últimas dos décadas, se ha consolidado para investigar diversas enfermedades neurológicas, gracias a su corto ciclo de vida, su facilidad de manipulación genética y la presencia de comportamientos complejos comparables a modelos más avanzados (264). En esta mosca existe una serie de uniones neuromusculares glutamatérgicas en el abdomen que se utilizan para explorar los mecanismos de sinaptogénesis (34,266). Los análisis electrofisiológicos permiten evaluar la liberación de neurotransmisores desde las terminales nerviosas presinápticas y la activación de receptores de glutamato en la placa motora del músculo, siendo de gran utilidad para caracterizar fenotipos relacionados con el TEA en *Drosophila* (267,268). Cabe destacar que estas neuronas motoras tienen el soma en el SNC, y extienden sus axones hacia músculos diana siguiendo trayectorias específicas y formando patrones de ramificación bien definidos. Esta característica cobra particular relevancia dado que, en humanos, las neuronas glutamatérgicas corticales representan aproximadamente el 80% de la actividad metabólica cerebral total y se ha demostrado que en sujetos con TEA presentan disfunciones (111,193,269).

Si bien la mayoría de los estudios sobre la interacción entre microbiota intestinal y SNC han utilizado modelos murinos, *Drosophila* se posiciona como un modelo experimental versátil y potente que permite estudiar, con gran precisión, los mecanismos moleculares mediante los cuales los microorganismos intestinales pueden modular la función cerebral (264,265).

### II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El uso de modelos murinos en estudios sobre el eje MIC implica desafíos considerables en términos éticos, económicos, de tiempo y de recursos humanos. En contraposición, *D. melanogaster* es un modelo experimental alternativo debido a su bajo costo, facilidad para la manipulación genética y la disponibilidad de herramientas para el análisis funcional del SNC. En este capítulo proponemos utilizar la mosca de la fruta para

investigar el efecto del microbioma intestinal de niños con TEA, específicamente evaluando el impacto de bacterias intestinales del género *Clostridium* en la modulación del SNC.

Los **OBJETIVOS** específicos propuestos para este capítulo fueron:

1. Analizar el efecto de la microbiota intestinal de niños con TEA sobre el SNC de *D. melanogaster*, en comparación con la microbiota de sujetos neurotípicos.
2. Aislar, identificar y caracterizar bacterias del género *Clostridium* en muestras fecales de niños con diagnóstico de TEA, y analizar su efecto en el SNC de *D. melanogaster*.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este estudio prospectivo incluyó a 7 niños diagnosticados con TEA, de los cuales seis fueron varones, con edades entre 4 y 10 años. Los participantes fueron reclutados bajo el proyecto de investigación PI23/00175 dirigido por la Dra. Rosa del Campo en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, y el estudio fue aprobado por un Comité de Ética (Referencia PI23/00747). Todos los niños contaban con diagnóstico clínico confirmado de TEA conforme a los criterios establecidos en el DSM-V, y no se realizaron modificaciones en su dieta habitual.

Cada niño proporcionó tres muestras de heces recogiendo la primera defecación del día en envases estériles y conservadas en condiciones de anaerobiosis. Las muestras se sembraron en medios de cultivo selectivos inmediatamente después de la recolección y, posteriormente, se congelaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 2. DISEÑO EXPERIMENTAL EN *D. melanogaster*

El experimento constó de cuatro variantes experimentales:

1. **Colonización inicial:** Se añadieron heces de sujetos con TEA a la dieta estándar (agua, levadura, glucosa, harina de trigo, agar y ácido propiónico) de la mosca en una proporción 10% del peso, con el objetivo de sustituir su microbiota intestinal basal por una microbiota derivada de individuos con TEA.

2. **Aislamiento bacteriano y primera suplementación experimental:** Se aislaron distintas especies del género *Clostridium* (*Paraclostridium bifermentans*, *C. perfringens*, y *C. paraputrificum*) y dos especies distintas del género *Bifidobacterium* spp. (*B. lactofermentans* y *B. animalis*) a partir de las heces mediante cultivo en medios selectivos bajo condiciones anaerobias. Una vez aisladas y cultivadas en el laboratorio, se añadieron 50 µl del cultivo a 5 ml de la papilla habitual de la mosca.
3. **Segunda suplementación experimental:** Las cepas de *P. bifermentans* que mostraron efectos significativos en los ensayos de la primera suplementación experimental fueron incorporadas por separado a las heces de un donante sano (control), y también a las heces de un sujeto TEA. Ambas muestras de heces se añadieron a la dieta habitual de la mosca con el fin de evaluar el impacto aditivo o sinérgico sobre su sistema nervioso.
4. **Comparación de grupos experimentales:** Se analizó el efecto de la suplementación de las heces de los 7 grupos en las moscas: control interno (moscas con microbiota convencional); control positivo (línea mutante *FMR1* con heces TEA), heces de donante sano, heces de donante sano con *P. bifermentans*, heces sujeto TEA, heces de sujeto TEA con *P. bifermentans* y finalmente doble inóculo de heces de sujeto TEA.

---

### 3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS FECALES

Todas las muestras de heces se alicuotaron tras su recepción en el laboratorio y se congelaron a -80 °C durante 24 h. Las muestras fecales (5 g) se diluyeron con 20 mL de solución fisiológica estéril y se homogeneizaron. Para la siembra de las muestras se utilizó agar sangre como medio general y los siguientes medios selectivos: agar Difficile con 7% de sangre de oveja, agar Man Rogosa Sharpe (lactobacilos y enterococos), agar manitol salado (estafilococos), agar MacConkey (enterobacterias), agar Wilkins-Chalgren anaerobio (anaerobios totales), agar Brain Heart Infusion y agar selectivo para *Bifidobacterium*. Se incubaron a 37°C durante 24 h. Todos los medios del cultivo fueron adquiridos en Oxoid, LTD, (Cambridge, Inglaterra), y para la identificación bacteriana se utilizó espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Las bacterias anaerobias

fueron aisladas en medio selectivo (agar Wilkins-Chalgren) y cultivadas en condiciones de anaerobiosis. Para administrar las heces a las moscas, se procedió a una etapa de liofilización, lo que mantenía la integridad de las bacterias, y posteriormente se rehidrataron antes de añadirse a la papilla de las moscas.

---

#### 4. SUPLEMENTACIÓN CON MICROBIOTA DE SUJETOS TEA

Las heces de pacientes con TEA fueron procesadas como se describe en el apartado anterior y mezcladas con la dieta estándar de la mosca antes de su solidificación, a temperatura ambiente. Los embriones recién colectados fueron cultivados en esta dieta desde su eclosión, permitiendo la colonización temprana de su microbiota intestinal.

---

#### 5. ALMACENAMIENTO Y GENÉTICA DE *D. melanogaster*

Todas las líneas de moscas se mantuvieron a 25°C de temperatura en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con humedad constante del 60%. Las líneas utilizadas del Bloomington Stock Center fueron UAS-LacZ (BL-8529) y FMRX-1.

---

#### 6. HISTOLOGÍA E INMUNOFLUORESCENCIA

Las uniones neuromusculares fueron disecadas y fijadas con formaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 10 min; las muestras se lavaron 3 veces durante 15 min con PBS + 0,4% Triton, se bloquearon durante 1 hora con PBS + 0,4% Triton + 5% BSA, se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios, se lavaron 3 veces durante 15 min, se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 2 h y se montaron en medio de montaje *Vectashield*.

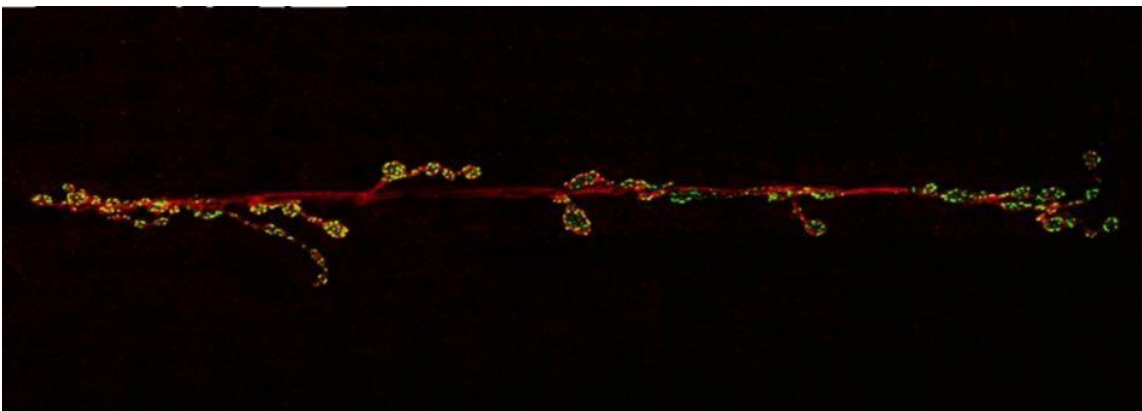
Los anticuerpos primarios utilizados fueron *anti-bruchpilot-NC82-mouse* (1/50; DSHB) para reconocer la proteína presináptica *Bruchpilot* y *anti-HRP rabbit* (1/400; Cell Signaling) para reconocer las membranas de neuronas. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron *anti-mouse Alexa 488* (1/500; Invitrogen) y *anti-rabbit Alexa 568* (1/500; Invitrogen). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Leica SP5, objetivo de inmersión de aceite 63x y secciones en Z de 0,8 µm.

---

#### 7. CUANTIFICACIÓN

El efecto de esta intervención en el SNC de la mosca fue evaluado en larvas de tercer estadio (L3) mediante el análisis de la unión neuromuscular, **cuantificando el número de**

**sinapsis** como marcador del desarrollo neurológico (Figura 8). Además, en moscas adultas se evaluaron dos parámetros fisiológicos: locomoción espontánea y supervivencia. La morfología de las neuronas se determinó por el volumen total de cada unión neuromuscular, y fue cuantificado utilizando la herramienta *Surface* del software Imaris (versión 6.3.1). El número de sinapsis (*anti-NC82; DSHB*) fue cuantificado mediante la herramienta *Spots* del mismo software, estableciendo un tamaño mínimo de 0,5  $\mu\text{m}$  para las zonas activas en las muestras control, y aplicando estos mismos parámetros al resto de condiciones experimentales. También se empleó el software FIJI (ImageJ 1.52v) para análisis complementarios.



**Figura 8.** Imagen de una motoneurona de la mosca de la fruta en el microscopio confocal. En rojo se observa el axón y en verde las sinapsis que permiten su cuantificación.

---

#### 8. ENSAYOS DE VIABILIDAD

Para comprobar la viabilidad y la esperanza de vida de los grupos de moscas, se recogieron cinco réplicas de 30 machos adultos de 1 a 4 días de edad en viales que contenían medios estándar de *Drosophila* y se transfirieron cada 2-3 días a medios frescos de la misma cultivándose en ciclos de luz/oscuridad de 12:12 h a 25°C.

---

#### 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

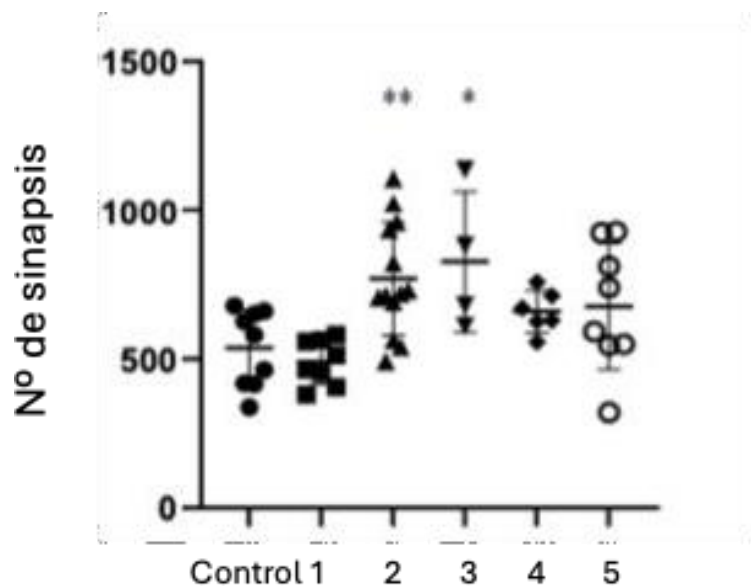
Los resultados fueron analizados utilizando el software *GraphPad Prism 5* ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Las variables cuantitativas se dividieron en paramétricos y no paramétricos utilizando la prueba de normalidad de *D'Agostino* y *Pearson (omnibus)*, y las varianzas fueron analizadas mediante la prueba F de *Snedecor*. Para los parámetros

paramétricos se utilizaron la prueba *t de Student* y *ANOVA* con prueba *post hoc* de *Bonferroni* (para comparaciones múltiples sobre la misma variable), aplicando la corrección de *Welch* cuando fue necesario. Para los parámetros no paramétricos se utilizaron la prueba de *Mann–Whitney* y la prueba de *Kruskal–Wallis* con *post hoc* de *Dunn*. Los ensayos de supervivencia fueron analizados con la prueba de *Mantel–Cox*. El valor límite para rechazar la hipótesis nula y considerar las diferencias entre los casos como estadísticamente significativas fue  $p < 0,05$  (\*). Otros valores de  $p$  se indican como \*\* cuando  $p < 0,01$  y \*\*\* cuando  $p < 0,001$ .

#### IV. RESULTADOS

##### 1. COLONIZACIÓN INICIAL

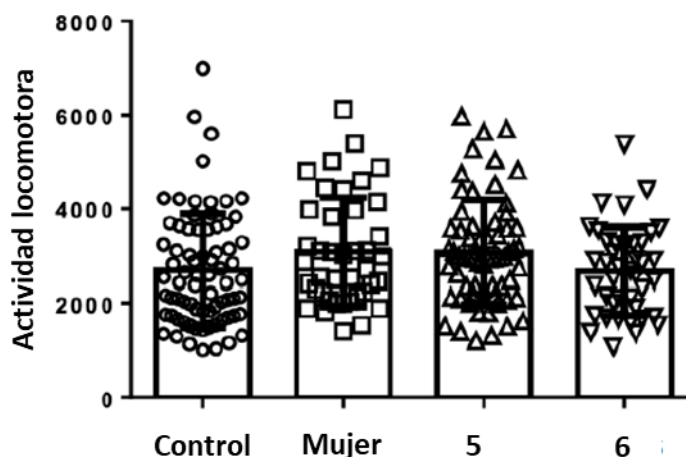
En un primer análisis experimental, se observó un aumento significativo en el número de sinapsis en las larvas cuya microbiota intestinal fue reemplazada por microbiota TEA (Figura 9), demostrando que esta microbiota condiciona los procesos asociados al desarrollo sináptico.



**Figura 9. Efecto del control vs. microbiota TEA en el número de sinapsis.** Se muestra el número de sinapsis por motoneurona en la unión neuromuscular. Las figuras geométricas representan el número de sinapsis en una única motoneurona:

●: larvas alimentadas con heces control; ■: alimentadas con heces de una niña con TEA (1); ▲, ▼, ◆ y ○: larvas alimentadas con heces de niños con TEA (2, 3, 4 y 5). Se muestra también la media  $\pm$  error estándar de la media en cada caso.

Con el fin de evaluar si estas modificaciones estructurales se traducían en alteraciones funcionales a nivel del SNC, se analizaron los mismos grupos experimentales en moscas adultas mediante pruebas de locomoción. Estas se llevaron a cabo a lo largo del tiempo con la intención de detectar efectos progresivos en el comportamiento motor. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento locomotor entre los grupos tratados y los controles (Figura 10), lo que sugiere que el aumento en el número de sinapsis no se asoció necesariamente con un déficit funcional en esta etapa. Además, el seguimiento se extendió hasta etapas tardías de la vida de los individuos, momento en el cual la disminución de la actividad locomotora parecía estar asociada principalmente al envejecimiento natural y no al tratamiento experimental.



**Figura 10. Efecto del tipo de microbiota adquirida sobre la actividad locomotora.**

Se muestra el número de veces que la mosca atraviesa el haz infrarrojo durante un período de 72 horas.

Las figuras geométricas representan los datos individuales del número de desplazamientos de una única mosca:

- : alimentadas con heces control.
- : alimentadas con heces de una niña con TEA (Mujer).
- ▲ : alimentadas con heces de un niño con TEA (5).
- ▼ : alimentadas con heces de otro niño con TEA (6).

Las barras indican la media del movimiento de todas las moscas alimentadas con el mismo tipo de heces  $\pm$  error estándar de la media.

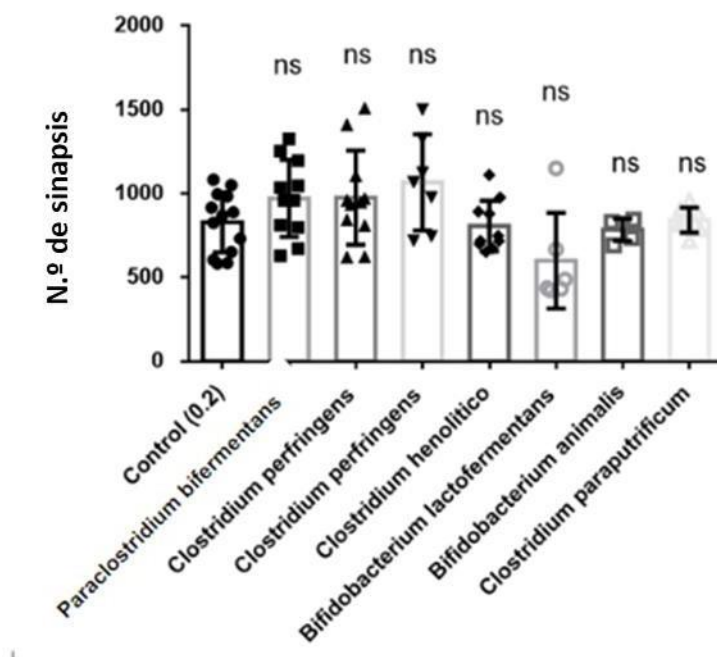
No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

## 2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y PRIMERA SUPLEMENTACIÓN EXPERIMENTAL

Estos resultados motivaron un nuevo experimento centrado en el estudio de bacterias de microbiota TEA, con el objetivo de identificar las especies o géneros bacterianos implicados en la patología. Para ello, se diseñó un segundo experimento enfocado en analizar el efecto de especies del género *Clostridium*, como *P. bifermentans*, *C.perfringens*, y *C. paraputrificum*, y dos especies del género *Bifidobacterium* spp., *B.lactofermentans* y *B. animalis*), todas ellas aisladas de heces de niños con TEA.

Las especies del género *Clostridium* fueron administradas a las moscas con el fin de analizar su efecto directo sobre el SNC. Utilizando el mismo procedimiento de estudio de la unión neuromuscular descrito previamente, los resultados no mostraron

diferencias significativas en el número de sinapsis en comparación con el grupo control (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de la administración de distintas especies de *Clostridium* sobre el número de sinapsis en el grupo control. Se muestra el número de sinapsis por motoneurona en la unión neuromuscular. Las figuras geométricas representan el número de sinapsis en una única motoneurona:

● larvas alimentadas con heces control ■ larvas alimentadas con aislados de *P. bifementans*; ▲ y ▼ larvas alimentadas con aislados de *C. perfringens*; ◆ larvas alimentadas con aislados de *C. perfringens* variedad hemolítica; ○ larvas alimentadas con aislados de *B. lactofermentans*; □ larvas alimentadas con aislados de *B. animalis* y △ larvas alimentadas con aislados de *C. paraputrificum*, respectivamente. Se representa también la media  $\pm$  error estándar de la media en cada caso.

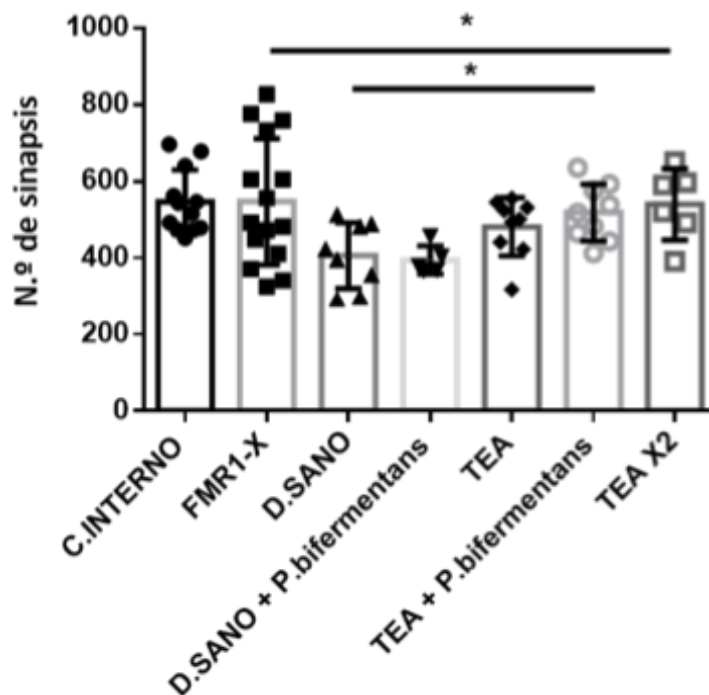
### 3. SUPLEMENTACIÓN EXPERIMENTAL Y COMPARACIÓN CON GRUPOS EXPERIMENTALES

En base a los resultados previamente obtenidos, se diseñó un tercer experimento utilizando las heces de un único niño con TEA. Como control negativo se utilizaron heces de un donante sano, mezcladas con la dieta estándar de *Drosophila*; como control positivo, se empleó la línea mutante *FMR1*, modelo genético de TEA ampliamente validado.

Adicionalmente, la cepa *P. bifementans* que había sido aislada en la microbiota del sujeto TEA, fue añadida tanto a las heces del donante sano como a las del sujeto TEA,

con el objetivo de evaluar su efecto específico. Considerando la posible influencia de la dosis fecal sobre el número de sinapsis, se incluyó un quinto grupo experimental suplementado con el doble de carga fecal (20% peso/peso).

Los resultados mostraron diferencias significativas en el número de sinapsis entre los grupos alimentados con heces del donante sano suplementadas con *P. bif fermentans* y los alimentados con heces del sujeto TEA suplementadas con la misma especie bacteriana (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de la administración de microbiota intestinal control frente a donante sano, paciente con TEA y *P.bifermentans* sobre el número de sinapsis. Se muestra el número de sinapsis por motoneurona en la unión neuromuscular. Las figuras geométricas representan el número de sinapsis en una única motoneurona: ● larvas alimentadas con heces control; ■ larvas portadoras del gen FMR1; ▲ alimentadas con heces de donante sano; ▼ heces de donante sano + *P. bifermentans*; ◆ heces de paciente con TEA; ○ heces de paciente con TEA + *P. bifermentans*; □ heces de paciente con TEA con doble carga fecal. Se representa también la media  $\pm$  error estándar de la media en cada caso.

#### 4. EFECTO FUNCIONAL SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO

Con el objetivo de evaluar si el aumento en el número de sinapsis observado tenía una repercusión funcional, se llevaron a cabo ensayos de locomoción y supervivencia en moscas adultas pertenecientes a cada uno de los genotipos experimentales. Para este análisis, los individuos adultos fueron separados por sexo. En los machos, se observó que las moscas alimentadas con heces de un paciente con TEA en dosis doble mostraban una alteración en la locomoción comparable a la observada en las moscas *FMR1* (modelo positivo de TEA), lo que sugiere una posible disfunción motora. No obstante, los resultados no fueron concluyentes.

#### V. DISCUSIÓN

El TEA se clasifica dentro de las enfermedades del neurodesarrollo con inicio en edades tempranas, típicamente durante los tres primeros años de vida, un periodo crítico de transformación tanto a nivel neuronal como intestinal. Durante esta etapa, tiene lugar la adquisición y establecimiento de la microbiota intestinal, caracterizado por una rápida expansión y diversificación microbiana (208,270). Desde una perspectiva biológica, resulta relevante considerar que estos periodos sensibles de maduración microbiana podrían coincidir con momentos críticos en la organización funcional de otros sistemas clave implicados en el eje MIC, especialmente durante eventos como la sinaptogénesis, proceso esencial en la consolidación de funciones cognitivas complejas (96). En este contexto, los experimentos descritos en este trabajo fueron diseñados para modelar, utilizando un organismo genéticamente manipulable y de rápida reproducción como *D. melanogaster*, una posible interacción paralela entre la colonización microbiana y eventos del neurodesarrollo. Se focalizó particularmente en la sinaptogénesis, debido a su papel central en el establecimiento de redes neuronales funcionales.

Los resultados obtenidos permiten plantear hipótesis sobre el papel de la microbiota en la modulación de eventos neurobiológicos tempranos. En una primera aproximación, observamos un aumento significativo en el número de sinapsis en la unión neuromuscular de larvas alimentadas con microbiota fecal de pacientes con TEA. Este hallazgo concuerda con evidencias previas que proponen que ciertos componentes microbianos pueden actuar como moduladores del neurodesarrollo, promoviendo una

sinaptogénesis aumentada o desregulada (269,271). En modelos animales de TEA, se ha descrito una excesiva densidad de espinas dendríticas en la corteza cerebral, lo que sugiere una poda sináptica deficiente durante el desarrollo (269,271). Esta sinaptogénesis anómala se ha relacionado con fenómenos de hiperconectividad neuronal, especialmente en regiones frontotemporales, áreas implicadas en la cognición social y la comunicación (272,273).

La relevancia funcional de la microbiota en este contexto también ha sido demostrada en estudios con animales GF, donde se han observado alteraciones en la expresión de proteínas sinápticas como la sinaptofisina y PSD-95, así como deficiencias en la plasticidad sináptica y la conectividad funcional (270,274). Así, la ausencia o alteración de microbiota intestinal en etapas tempranas parece comprometer la maduración sináptica y favorecer patrones de conectividad cerebral atípicos, como los observados en el TEA (275).

A pesar del aumento sináptico observado, no se detectaron alteraciones funcionales evidentes en términos de locomoción en moscas adultas, lo que sugiere que el número de sinapsis no necesariamente implica una función neuronal adecuada. Estos datos plantean la posibilidad de que no solo el número, sino también la calidad funcional de las sinapsis sea clave para la manifestación de fenotipos conductuales. Esta distinción entre estructura sináptica y funcionalidad podría ser especialmente significativa en el contexto de TEA, donde se ha descrito tanto una mayor densidad sináptica como una desregulación en formas de plasticidad como la depresión sináptica a largo plazo (269,276). Dicha alteración puede tener implicancias importantes en la poda sináptica, la coordinación motora y el procesamiento sensorial (277), y constituye una posible vía mecanística hacia los fenotipos conductuales del TEA (276,278).

Las limitaciones y las controversias relacionadas con las alteraciones en la composición microbiana de individuos TEA no han permitido esclarecer a nivel taxonómico las posibles bacterias implicadas. No obstante, metaanálisis recientes puntualizan las diferencias relativas a *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Dorea*, *Phascolarctobacterium*, *Catenibacterium*, *Odoribacter* y *Bifidobacterium*, que se mantienen estadísticamente significativas (171). Al evaluar el impacto de bacterias

específicas comúnmente alteradas en la microbiota de individuos con TEA, como especies del género *Clostridium* y *Bifidobacterium*, no se reprodujeron los efectos sinápticos observados con la microbiota completa. Este resultado sugiere que dichos efectos podrían depender de consorcios bacterianos complejos o de interacciones microbianas específicas, que no se replican al administrar bacterias de forma individual. Esta observación evidenció una limitación conceptual importante en el diseño experimental inicial: al aislar cepas bacterianas individuales presentes en microbiotas asociadas a TEA, se eliminan las complejas interacciones sinérgicas entre múltiples especies microbianas, así como la producción combinada de metabolitos o señales inmunomoduladoras, que podrían ser esenciales para inducir cambios en la sinaptogénesis. En condiciones experimentales simplificadas, como la administración de cepas aisladas, se pierde esta complejidad ecológica, lo cual podría explicar por qué no se reprodujeron de forma consistente los efectos observados con microbiotas completas. A partir de esta limitación, se planteó un tercer experimento centrado en *P. bifermentans*. Cuando esta bacteria fue administrada en combinación con heces de un donante sano o con la microbiota del propio paciente, se observó un aumento significativo en el número de sinapsis, apoyando su posible papel como modulador activo del eje intestino-cerebro. Este hallazgo sugiere que *P. bifermentans* podría actuar en sinergia con otros componentes del ecosistema microbiano intestinal, amplificando su influencia sobre procesos neurobiológicos como la sinaptogénesis.

Finalmente, la administración de una dosis doble de microbiota TEA provocó una reducción de la locomoción en adultos macho, generando un fenotipo similar al observado en el modelo genético *FMR1*. Esto sugiere una posible relación dosis-dependiente entre la composición microbiana y la alteración funcional del sistema nervioso, posiblemente a través del sistema nervioso periférico o mediadores neuro-inmunes.

En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el desarrollo paralelo e interdependiente de la microbiota intestinal y del SNC constituye una dimensión clave en el estudio de los trastornos del neurodesarrollo. La alteración en la adquisición secuencial de la microbiota podría tener un impacto directo sobre procesos como la

sinaptogénesis, afectando eventualmente las capacidades cognitivas. El uso de *Drosophila* como modelo permite una aproximación funcional y genética que puede ser útil para desentrañar mecanismos microbianos específicos implicados en el TEA, y plantea un marco experimental para el estudio futuro de terapias personalizadas basadas en la microbiota.

Una de las principales fortalezas de este trabajo radica en su diseño experimental innovador. Si bien *D. melanogaster* ha sido ampliamente utilizada para investigar mecanismos genéticos subyacentes a trastornos del neurodesarrollo como el TEA, y en estudios sobre la composición y función de su propia microbiota intestinal, hasta ahora no se había empleado este modelo para aportar evidencia preliminar sobre el posible papel de la microbiota intestinal humana en la modulación de la sinaptogénesis. Este enfoque representa un aporte novedoso en el uso de modelos simples para explorar fenómenos complejos en el eje MIC y abre nuevas posibilidades para estudios mecanísticos en un sistema experimental altamente manipulable.

Sin embargo, el estudio presenta limitaciones que deben ser consideradas. En primer lugar, aunque *D. melanogaster* es un modelo genético robusto y ampliamente validado en estudios de neurobiología y microbiota, sus diferencias fisiológicas con los mamíferos, particularmente en lo que respecta a la organización del sistema nervioso y la ausencia de un sistema inmunológico adaptativo, limitan la extrapolación directa de los hallazgos a humanos (279,280). La simplicidad del modelo, si bien permite un control riguroso de variables experimentales, no captura la complejidad de las interacciones neuro-inmunológicas que ocurren en modelos más cercanos al humano.

Una segunda limitación relevante se relaciona con los ensayos funcionales de locomoción. Aunque se observó una reducción significativa en la actividad locomotora de machos adultos expuestos a una dosis doble de microbiota fecal de un paciente con TEA, fenotipo comparable al observado en el modelo *FMR1*, el resto de los grupos experimentales no mostró diferencias significativas. Estos resultados poco concluyentes podrían explicarse por una baja sensibilidad del ensayo de locomoción utilizado, o por la especificidad limitada de esta prueba para detectar disfunciones sutiles del SNC en modelos de TEA. Es posible que las alteraciones observadas a nivel de sinaptogénesis no

se traduzcan necesariamente en cambios conductuales detectables mediante esta prueba, o que se requieran condiciones experimentales más específicas para revelar estos efectos.

Asimismo, el análisis de bacterias aisladas, específicamente especies representativas de *Clostridium* y *Bifidobacterium*, demostró que, en la mayoría de los casos, estas no replicaron por sí solas los efectos sinápticos inducidos por la microbiota completa. Este hallazgo pone de relieve una limitación conceptual del diseño inicial: la subestimación del papel de las interacciones microbianas complejas y de los consorcios funcionales que caracterizan la microbiota intestinal (281). Como ha sido ampliamente comunicado, la acción sinérgica entre distintos taxones microbianos y la producción colectiva de metabolitos pueden ser fundamentales para modular respuestas del hospedador (99,282).

Adicionalmente, la ausencia de estudios metagenómicos, transcriptómicos o metabolómicos constituye una limitación metodológica importante. Estos enfoques habrían permitido identificar metabolitos clave, genes diferencialmente expresados o rutas metabólicas involucradas en la modulación de la sinaptogénesis, facilitando la elucidación de mecanismos causales más específicos. Asimismo, no se evaluaron parámetros inmunológicos ni marcadores de inflamación neuronal, los cuales representan vías fundamentales en la comunicación intestino-cerebro y están implicados en procesos como la poda sináptica y la maduración neuronal (120). Dado el papel central del sistema inmune en el neurodesarrollo, su omisión constituye una limitación significativa en la comprensión integral del fenómeno observado.

En conjunto, este estudio sienta las bases para futuras investigaciones que puedan replicar y ampliar los experimentos aquí descritos, subsanando las limitaciones identificadas. En particular, la incorporación de enfoques multidimensionales que deberán integrar datos microbiológicos, neurobiológicos, inmunológicos y conductuales, lo que será crucial para construir un modelo más completo y robusto sobre cómo la microbiota intestinal puede influir en procesos clave del neurodesarrollo, particularmente en la sinaptogénesis



# Capítulo 2.

Reconocimiento del metabolito  
microbiano para-cresol:  
una revisión sistemática y  
metaanálisis

## CAPÍTULO II. RECONOCIMIENTO DEL METABOLITO MICROBIANO *P*-CRESOL EN EL TRASTORNO DE ESPECTRO AUTISTA: REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS

### I. ANTECEDENTES

Los TEA constituyen un grupo de trastornos del neurodesarrollo de inicio temprano, caracterizados por alteraciones en la interacción social y la comunicación, así como por comportamientos restringidos y estereotipados (29). A nivel mundial, se diagnostica actualmente a 1 de cada 100 niños con TEA, aunque las tasas globales se ven influenciadas por factores geográficos, étnicos y socioeconómicos, presentando una razón hombre/mujer de 4.2:1 (12,283). Sin embargo, es probable que la prevalencia real esté subestimada (12,283,284). Un diagnóstico adecuado es fundamental tanto para el tratamiento temprano del individuo como para el desarrollo de políticas públicas en torno al autismo.

La elevada presencia de comorbilidades en el TEA complica su diagnóstico, especialmente en edades tempranas. Actualmente, el diagnóstico se basa en la evaluación de la sintomatología, incluyendo aspectos socioafectivos y comportamientos estereotipados, restrictivos o repetitivos, siguiendo criterios establecidos como los del DSM-5 o la CIE-11, complementándose, si es necesario, con pruebas diagnósticas. La búsqueda de biomarcadores precisos sigue siendo una prioridad para mejorar el diagnóstico precoz.

Las comorbilidades asociadas al TEA no se limitan al SNC, como ocurre con la discapacidad intelectual, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad o el retraso del desarrollo. También se han reportado comorbilidades gastrointestinales en el 30% al 50% de los individuos con TEA, siendo las más comunes el estreñimiento, la distensión abdominal, el dolor abdominal y la diarrea (285). Se ha propuesto que la microbiota intestinal y sus metabolitos podrían contribuir a la fisiopatología del TEA (286–288). Entre estos metabolitos destaca el *p*-cresol, un compuesto aromático de síntesis exclusivamente bacteriana a partir del aminoácido tirosina, que se excreta en orina y heces. Se encuentra en el organismo en forma de *p*-cresol-sulfato, *p*-cresol glucurónido y *p*-cresol libre, aproximadamente en una proporción de 95:4:1 (159,163).

El *p*-cresol inhibe la enzima dopamina β-hidroxilasa, encargada de convertir la dopamina en noradrenalina (137); en modelos murinos, esta inhibición afectó los niveles sistémicos de dopamina (191,289). En personas con TEA, se han reportado alteraciones en los niveles de dopamina y serotonina, siendo esta última sintetizada en su mayor parte a nivel intestinal (290). Además, el *p*-cresol ha sido ampliamente estudiado *in vitro* por su impacto en el SNC, dado que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (175). Se han identificado al menos 55 especies bacterianas productoras de *p*-cresol o de sus metabolitos intermedios (160), incluyendo miembros de la clase *Clostridia*, significativamente incrementada en individuos con TEA (291).

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Dada la necesidad urgente de identificar biomarcadores objetivos que contribuyan a mejorar el diagnóstico y la comprensión del TEA, el estudio de compuestos aromáticos derivados de aminoácidos con actividad neurotóxica ha adquirido gran relevancia. Pese a la proliferación de estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos que han explorado la presencia y efectos de estos metabolitos en individuos con TEA, los resultados han sido heterogéneos y, en muchos casos, no concluyentes. Además, las variaciones en las metodologías empleadas para la cuantificación del *p*-cresol, las diferencias en el diseño de los estudios, y la diversidad de poblaciones clínicas analizadas, dificultan la integración y comparación directa de los hallazgos existentes.

Los **OBJETIVOS** propuestos para este capítulo son:

1. Identificar la evidencia científica sobre la relación entre la concentración de *p*-cresol en muestras biológicas y el TEA, evaluando su posible relevancia como marcador inespecífico de un estado proinflamatorio, el cual se ha asociado a manifestaciones clínicas del autismo durante ciertos periodos críticos del neurodesarrollo (entre los 2 y los 7 años).
2. Realizar un metaanálisis de aquellos estudios que comunicaron medidas estadísticas cuantificables del metabolito, con el fin de estimar de manera robusta su asociación con el TEA.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1. DISEÑO ESTUDIO Y ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Se llevó a cabo una revisión sistemática con metaanálisis realizada conforme a las directrices para Revisiones Sistemáticas y Metaanálisis PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (292) para dilucidar la evidencia científica del *p*-cresol como biomarcador en TEA. La búsqueda de artículos se realizó desde enero de 2011 hasta mayo de 2024 usando las bases de datos PubMed, Web of Science y Scopus. Se emplearon las siguientes combinaciones de descriptores *MeSH* y términos clave: ("p-cresol" OR "para-cresol" OR "4-cresol" OR "4-methylphenol" OR "p-cresylsulphate" OR "pCS" OR "p-cresylglucuronide" OR "pCG" OR "p-cresylglucoronate") AND ("autism" OR "autistic" OR "autism spectrum disorder" OR "ASD") NOT (review or systematic review). En la base de datos PubMed, la opción de búsqueda utilizada fue "all fields". En Web of Science, se seleccionó la opción de búsqueda por "theme" en todas las bases de datos. En Scopus, se empleó la búsqueda en "Title, Abstract, Keywords".

#### 2. CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

Tanto para la revisión como para el metaanálisis, se aplicaron los mismos los criterios de inclusión. Se seleccionaron únicamente aquellos estudios realizados en **población infantil** menor de 10 años diagnosticados **con TEA**, basado en los criterios del DSM, en cualquiera de sus ediciones. No se aplicó restricción en cuanto a la presencia o ausencia de alteraciones gastrointestinales.

Se incluyeron exclusivamente los artículos que hubieran realizado un análisis metabolómico en pacientes con TEA y en los que se hubiera **detectado p-cresol total en muestras biológicas**, específicamente en orina o heces. Todos los estudios que cuantificaron este metabolito fueron seleccionados para su inclusión en el metaanálisis. Se excluyeron, por tanto, aquellos trabajos basados en modelos animales o *in vitro*, los estudios de casos, así como las revisiones narrativas y revisiones sistemáticas. Finalmente, se limitaron los criterios de selección a manuscritos publicados en inglés y con acceso al texto completo.

### 3. EXTRACCIÓN DE DATOS Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS ESTUDIOS

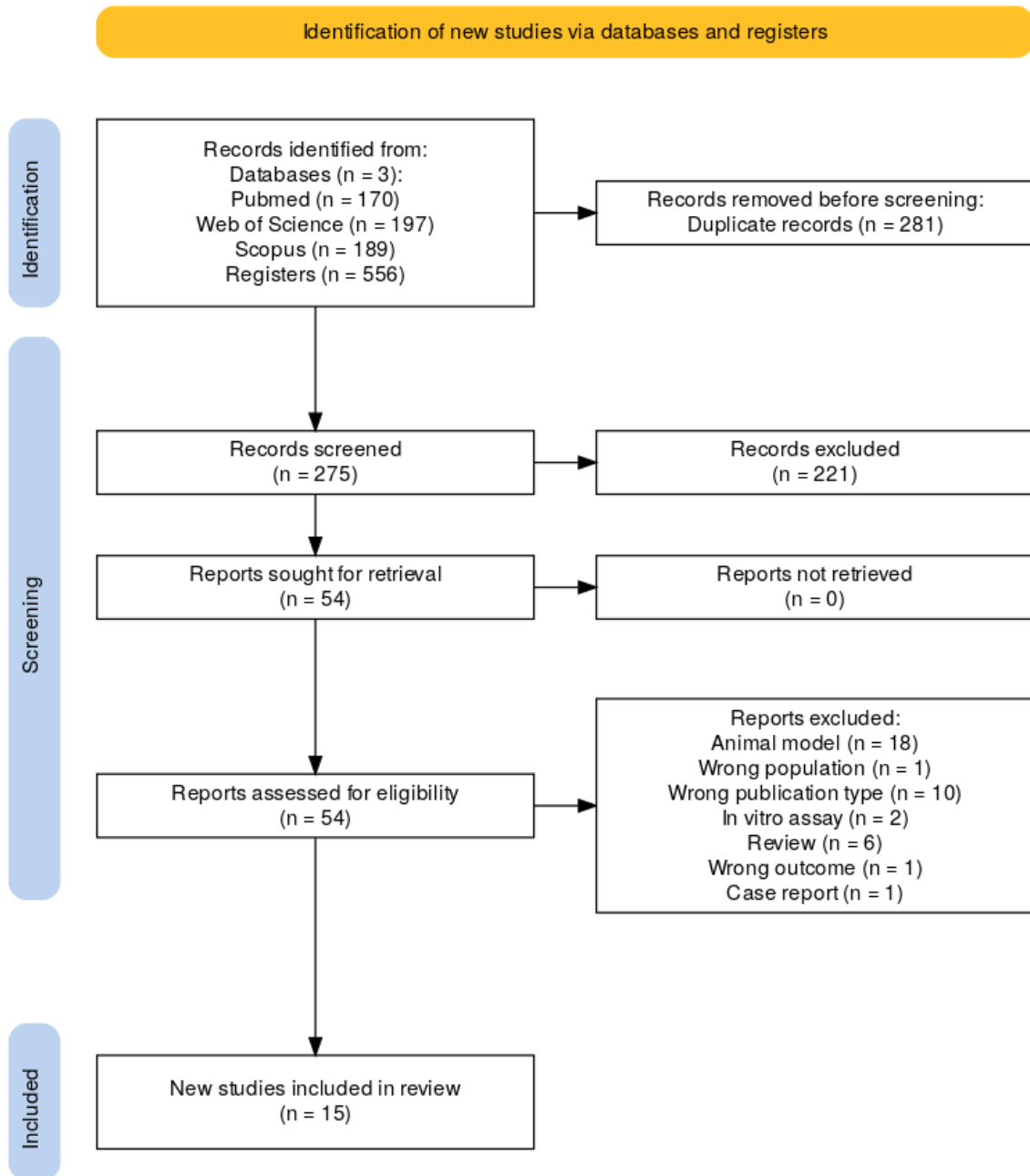
La extracción de datos se llevó a cabo de manera rigurosa, siguiendo un procedimiento estructurado. Dos investigadores independientes evaluaron por separado los resúmenes de todos los estudios identificados y determinaron su inclusión o exclusión atendiendo a los criterios de elegibilidad previamente definidos. En aquellos casos en los que surgieron discrepancias, se consultó a un tercer revisor, quien resolvió la discordancia basándose en el contenido del resumen. Solo aquellos estudios que cumplían con todos los criterios establecidos fueron seleccionados para su análisis posterior.

Una vez confirmada su elegibilidad, los artículos fueron descargados en formato compatible (RIS o PubMed) y gestionados mediante la plataforma Rayyan™, que facilitó la organización sistemática del proceso de cribado (293). La metodología seguida en esta etapa se representa de forma visual en el diagrama PRISMA (Figura 13), que permite seguir de manera transparente la progresión desde la identificación inicial de los estudios hasta la inclusión final.

De cada uno de los trabajos seleccionados se extrajo información detallada que permitiera contextualizar y comparar los hallazgos entre estudios. Se recogieron aspectos como el país en el que se desarrolló la investigación, el diseño metodológico empleado, el año de publicación, el tamaño muestral en los grupos con TEA y control, la edad y el sexo de los participantes, la presencia o no de comorbilidades intestinales, los criterios diagnósticos utilizados para establecer el diagnóstico de TEA, así como el tipo de muestra biológica en la que se cuantificó *p*-cresol. Finalmente, se consignaron tanto la concentración del metabolito como las técnicas específicas empleadas para su detección.

La evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos se llevó a cabo utilizando la herramienta AXIS (*Appraisal tool for Cross-Sectional Studies*) (294) aplicada mediante Microsoft Excel 365®. Esta herramienta está compuesta por 20 ítems que se responden con “sí”, “no” o “no se sabe”, sin otorgar una puntuación global, lo que permite un análisis detallado de las fortalezas y debilidades específicas de cada estudio. No obstante, con fines orientativos, se consideraron de alta calidad aquellos estudios

que obtuvieron más de 15 respuestas afirmativas, de calidad media los que obtuvieron entre 12 y 15, y de baja calidad aquellos con menos de 12 ítems respondidos afirmativamente.



**Figura 13. Diagrama de flujo PRISMA.** Muestra el proceso de identificación de los estudios pertinentes para la presente revisión sistemática y metaanálisis.

---

#### 4. METAANÁLISIS Y EVALUACIÓN DE LA HETEROGENEIDAD

El método estadístico aplicado para realizar la evaluación del metaanálisis fue el modelo de efectos aleatorios (*random-effects model*), implementado mediante el *software Review Manager* (Versión 5.1), considerando que los incluidos presentan diferencias sustanciales en cuanto al diseño metodológico, las características poblacionales, las intervenciones evaluadas e, incluso, en los métodos utilizados para la cuantificación del metabolito de interés. Este enfoque permite modelar la variabilidad tanto intraestudio como interestudio, asumiendo que los efectos verdaderos pueden diferir entre los estudios analizados.

Se estimaron las diferencias de medias junto con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, interpretándose una diferencia de medias positiva como indicativa de ausencia de diferencias significativas entre los grupos comparados. Para evaluar la heterogeneidad entre los tamaños del efecto, se calculó la estadística Q y se aplicó la prueba de chi-cuadrado, considerando un valor de  $p < 0,10$  como evidencia de heterogeneidad estadísticamente significativa. Asimismo, se utilizó la estadística I-cuadrado ( $I^2$ ) para cuantificar la magnitud de la heterogeneidad, categorizando los valores de  $I^2$  en heterogeneidad baja (<25%), moderada (>25%), sustancial (>50%) o considerable (>75%).

Con el objetivo de representar gráficamente las estimaciones puntuales de los efectos de los estudios y sus respectivos intervalos de confianza al 95%, se construyeron *forest plots* utilizando el software Stata, versión 18.0. Cabe señalar que, dado que no se incluyeron ensayos controlados aleatorizados en esta revisión sistemática y metaanálisis, no se llevó a cabo una evaluación formal del riesgo de sesgo.

### IV. RESULTADOS

---

#### 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS

La búsqueda arrojó un total de 556 artículos, de los cuales 170 se encontraron en PubMed, 197 en Web of Science y 189 en Scopus. Se eliminaron 281 registros por duplicidad; tras la revisión de títulos y resúmenes, se excluyeron 221 por no cumplir con los criterios de inclusión. De los 54 registros restantes, se descartaron: 18 estudios en

modelos animales, 2 en modelos *in vitro*, 6 revisiones, 1 por población incorrecta, 10 por diseño de estudio no pertinente, 1 reporte de caso y 1 por resultado no relevante. Finalmente, se seleccionaron 15 artículos para su inclusión en el análisis (147,163,170,187,189,194,295–303) (Tabla 3).

Según la afiliación institucional de los autores correspondientes, los estudios fueron publicados en cinco países: Italia, Francia, China, EE.UU. y Eslovenia, entre los años 2011 y 2024. Solo tres estudios evaluaron comorbilidades gastrointestinales funcionales.

1 **Tabla 3. Características de los estudios incluidos en el metaanálisis.**

	País	Diseño del estudio	Nº de sujetos (Hombre/Mujer)	Rango de edad(años)	Controles hermanos	Controles s/parentesco	Diagnóstico de autismo	Comorbilidades
Altieri <i>et al.</i> , 2011	Italia	Casos-control	59 (44/15)	2-18		59	DSM-IV	Ninguna
Wang <i>et al.</i> , 2012	China	NA	23 (21/2)	3-17	22	9	No disponible	Trastorno gastrointestinal
Angelis <i>et al.</i> , 2013	Italia	NA	10	4-10	10		DSM-IV	Ninguna
Gabriele <i>et al.</i> , 2014	Italia	Casos-control	33 (29/4)	4-16		33	DSM-IV	Ninguna
Gabriele <i>et al.</i> , 2016	Italia	Casos-control	53 (44/9)	1-20		59	DSM-IV	Ninguna
Kang <i>et al.</i> , 2018	EE.UU.	Cohorte	23 (22/1)	6-14		21	ATEC/PDD-BI	Trastorno gastrointestinal
Kang <i>et al.</i> , 2020	EE.UU.	Ensayo Clínico Abierto	18	7-16		20	ADI-R	Síntomas gastrointestinales
Turriziani <i>et al.</i> , 2021	Italia	Estudio prospectivo-transversal observacional	21 (18/3)	2-8			DSM-IV	Ninguna

## 2. NIVELES ELEVADOS DE *p*-CRESOL EN ORINA

Se detectaron concentraciones significativamente más altas de *p*-cresol y de sus metabolitos derivados *p*-cresol-sulfato y *p*-cresol glucurónico en la orina de participantes con TEA en comparación con los controles (147,163,187,189,295,299,300,302). De forma similar, Osredkar *et al.* también detectaron niveles elevados de *p*-cresol-sulfato (194).

El primer estudio incluido en esta revisión fue publicado en 2011 por Altieri *et al.*, en niños con TEA severo, en el que la concentración urinaria total de *p*-cresol fue de  $123,5 \pm 12,8$   $\mu\text{g/ml}$ , mientras que en niños con desarrollo neurotípico fue de  $91,2 \pm 8,7$   $\mu\text{g/ml}$ . Los autores destacaron que los niveles de *p*-cresol estaban asociados con el sexo y la edad, siendo más altos en niñas y en niños más pequeños ( $134,1 \pm 20,1$   $\mu\text{g/ml}$  frente a  $70,3 \pm 6,7$   $\mu\text{g/ml}$ ); no se observaron diferencias significativas entre TEA y controles en niños mayores de 8 años (295).

Posteriormente, en 2014, Gabriele *et al.* llevaron a cabo un estudio en pacientes pediátricos en Francia, con el objetivo de replicar los hallazgos iniciales de Altieri *et al.* 2011 en Italia. En esta ocasión, los autores ampliaron el análisis midiendo las tres formas urinarias *p*-cresol libre, sulfato y glucurónico. Los resultados mostraron un aumento de *p*-cresol en TEA ( $98,8 \pm 17,3$   $\mu\text{g/ml}$ ) frente a controles ( $52,0 \pm 7,8$   $\mu\text{g/ml}$ ), destacando las proporciones correspondientes a *p*-cresol-sulfato, glucurónico y libre (94,99%, 4,93% y 0,08%, respectivamente, en TEA frente a 94,87%, 5,05% y 0,08% en controles). Además, se observó una relación directa entre los niveles de *p*-cresol y su derivado sulfatado con observaciones clínicas como retraso en el inicio de la marcha, presencia de estereotipias motoras y conductas compulsivas/repetitivas de deglución (163).

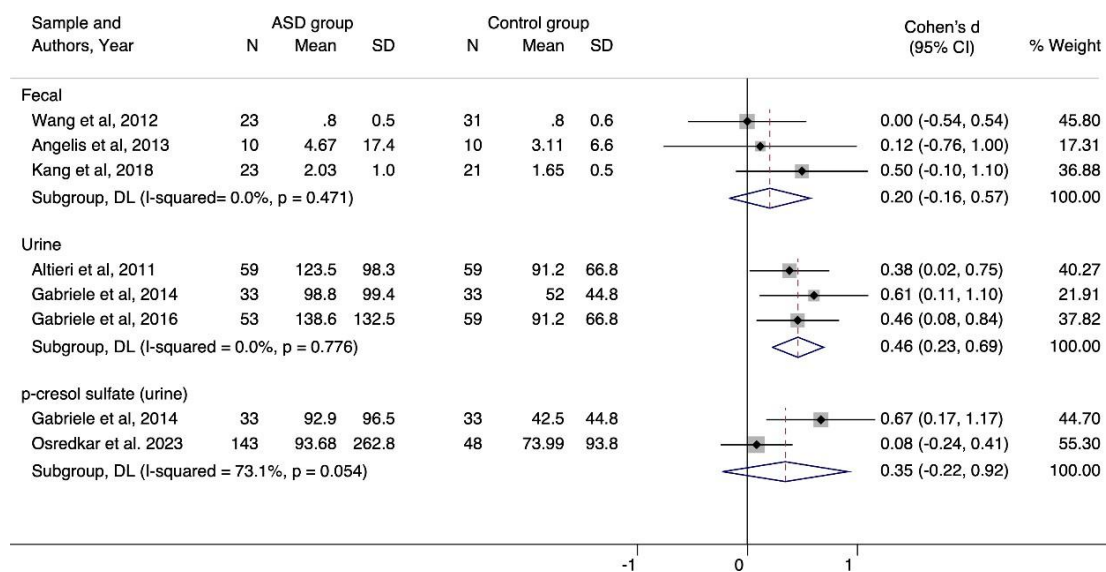
Posteriormente, dos estudios independientes (187,299) sugirieron que el aumento del *p*-cresol sería una consecuencia directa de la disminución de la motilidad intestinal, junto con alteraciones de la microbiota y una activación excesiva del sistema inmune. Gabriele *et al.*, 2016 compararon los niveles de *p*-cresol según los síntomas gastrointestinales, detectando valores más altos en casos de estreñimiento ( $218,2 \pm 40,8$   $\mu\text{g/ml}$ ) que en pacientes con heces normales ( $97,9 \pm 20,5$   $\mu\text{g/ml}$ ) o diarrea ( $88,6 \pm 27,1$   $\mu\text{g/ml}$ ) (187). Por su parte, Mussap *et al.* confirmaron que la concentración de *p*-cresol

se relaciona directamente con la gravedad de los síntomas centrales del TEA (299). Más adelante, Daneberga *et al.* relacionaron niveles elevados de *p*-cresol con una menor proporción Bacteroidota/Bacillota, aunque sin alcanzar significancia estadística ( $p = 0,059$ ) (147).

Gevi *et al.*, 2020 correlacionaron el *p*-cresol urinario con los niveles de dopamina en niños con dieta deficiente en tirosina, sugiriendo una posible justificación del mecanismo de acción (300). En consecuencia, se ha vinculado el aumento de dopamina con síntomas del TEA como las conductas estereotipadas (304,305). Otro hallazgo relevante fue la detección de niveles elevados de vitamina C en niños con TEA, que actúa como cofactor esencial para la inactivación de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, enzima que cataliza la conversión de dopamina en norepinefrina (306).

Aunque los siete estudios anteriores demostraron una asociación entre niveles urinarios elevados de *p*-cresol y la sintomatología del TEA, Turriziani *et al.* no encontraron dicha asociación. En su estudio, concluyeron que el *p*-cresol no contribuye a los cambios conductuales, ya que no se observaron diferencias significativas en las escalas sintomáticas del TEA tras la movilización intestinal en niños autistas con estreñimiento crónico (302).

Los resultados de este metaanálisis muestran que los niveles urinarios de *p*-cresol fueron estadísticamente más altos en niños con TEA que en controles sanos, con gran homogeneidad en los resultados de los tres estudios incluidos. En contraste, no se alcanzó significancia estadística para el *p*-cresol-sulfato urinario, aunque la tendencia observada en los dos estudios seleccionados también fue hacia niveles más altos en TEA que en controles (Figura 14).



**Figura 14.** Forest-plot que compara la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) de *p*-cresol en heces y orina, y de *p*-cresol sulfato en orina de sujetos con TEA y controles sanos. SD, desviación estándar;  $I^2$ , I-cuadrado.

### 3. NIVELES ELEVADOS DE *P*-CRESOL EN HECES

Cuatro estudios han comunicado niveles más elevados de *p*-cresol en las heces de niños con TEA en comparación con controles con desarrollo típico (170,297,298,303); mientras que por el contrario, un único estudio no detectó diferencias significativas (296). Los estudios que identificaron una asociación positiva con el *p*-cresol también informaron que la tiramina O-sulfato, un metabolito con estructura química similar al 4-etilfenil sulfato y al *p*-cresol-sulfato, se encontraba subrepresentado en niños con TEA en comparación con los controles sanos.

Posteriormente, en 2020, en un ensayo abierto, Kang *et al.* describieron los efectos beneficiosos de la transferencia de microbiota fecal, la cual redujo los niveles elevados de *p*-cresol-sulfato, 4-hidroxifenilacetato e indol en heces, además de modificar la abundancia relativa de *Prevotella*, *Bifidobacterium* y *Desulfovibrio* (298).

*Desulfovibrio* es una bacteria implicada en procesos de reducción de sulfato en el intestino humano. Su abundancia no mostró correlación significativa con los niveles de *p*-cresol; sin embargo, sí se observó una correlación negativa significativa con *p*-cresol-

sulfato lo que sugiere que podría ser un potencial marcador. Además, se identificó una correlación significativa con los niveles de sulfato en heces.

Finalmente, en el estudio de casos-controles de Vernocchi *et al.*, se describió una asociación estadística entre *p*-cresol y el subgrupo de niños con TEA que no recibieron tratamiento antibiótico. A pesar de estos hallazgos (303), en el estudio de Wang *et al.*, 2012 no encontraron diferencias significativas en los niveles de *p*-cresol entre los grupos con TEA y los controles. Sin embargo, sí identificaron diferencias entre los dos subgrupos control considerados en el estudio (hermanos vs. no familiares) (296).

Nuestro metaanálisis realizado en muestras fecales no fue concluyente; sin embargo, los niveles de *p*-cresol fueron consistentemente más altos en el grupo con TEA, aunque sin alcanzar significancia estadística.

## V. DISCUSIÓN

Las investigaciones sobre el eje intestino-cerebro han aportado nuevas evidencias sobre cómo la microbiota intestinal y sus metabolitos pueden influir en condiciones del neurodesarrollo como el TEA (307). La ausencia de biomarcadores diagnósticos tempranos ha impulsado el estudio de metabolitos bacterianos producidos por la microbiota intestinal, como el *p*-cresol, cuya presencia se ha encontrado en concentraciones elevadas en orina y heces de niños con TEA. En este trabajo, hemos realizado el primer metaanálisis que revisa sistemáticamente los datos publicados hasta mayo de 2024 y examina los niveles de *p*-cresol y sus derivados medidos en muestras biológicas de pacientes con TEA.

El análisis de los datos previamente publicados no evidenció una asociación relevante entre el metabolito y el TEA en muestras fecales. Los estudios incluidos en el metaanálisis (170,296,297) fueron homogéneos, lo que indica una consistencia en los tamaños del efecto comunicado. Este hallazgo se refuerza con la ausencia de heterogeneidad significativa entre los estudios. Por lo tanto, se puede concluir que la detección de este metabolito en heces tendría una utilidad limitada como marcador diagnóstico.

Sin embargo, se evidenció que los niveles urinarios de *p*-cresol fueron hasta un 40% más altos en la población con TEA en comparación con los controles neurotípicos (163,187,295,302), afectando de forma más evidente a los niños entre 2 y 7 años, un período crítico para el desarrollo cerebral (295). En cuanto al metaanálisis de los estudios realizados en orina (163,187,295), nuestros resultados mostraron un efecto combinado moderado-alto ( $p = 0,46$ ), con una baja heterogeneidad ( $I^2 = 0,00\%$ ), lo que sugiere que la detección de *p*-cresol en orina podría tener potencial como biomarcador para el TEA.

No está completamente claro cómo el *p*-cresol podría afectar a la condición autista; sin embargo, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han indicado que podría estar asociado a alteraciones a nivel del SNC, especialmente en edades tempranas (175,191). No obstante, se trata de un metabolito que merece atención como potencial biomarcador de las alteraciones microbiológicas observadas en el TEA.

La microbiota intestinal en individuos con TEA se caracteriza por una mayor abundancia de *Clostridia* y una disminución significativa de *Bifidobacterium* (291). A nivel metabólico, también se han observado niveles elevados de metabolitos neuroactivos derivados de bacterias intestinales en un subgrupo de niños diagnosticados con TEA (307). La metabolómica ha aportado evidencia sólida de una relación entre la gravedad de los síntomas nucleares, evaluados mediante la escala ADOS-2, y el perfil metabólico urinario (299).

A pesar de la búsqueda exhaustiva, el metaanálisis está inherentemente limitado por el bajo número de estudios que cumplieron criterios de inclusión. En primer lugar, el diseño del estudio, así como la especificidad y sensibilidad de los métodos de detección utilizados, fueron variables entre los trabajos analizados. Las metodologías empleadas para la determinación del *p*-cresol son diversas; sin embargo, no todos los estudios especificaron claramente los metabolitos detectados ni publicaron concentraciones promedio basadas en múltiples mediciones. Además, algunos factores de confusión como el sexo, la genética, la dieta, el uso de medicamentos, el estilo de vida, así como las variantes de especies bacterianas, podrían haber contribuido a la obtención de resultados no significativos o sesgados. En segundo lugar, se identificó una

heterogeneidad significativa entre los estudios al agrupar los datos obtenidos de muestras fecales. Todos los estudios incluidos fueron de tipo caso-control; por lo tanto, se requiere su validación en series amplias de casos de individuos con sospecha de TEA y en niños con otras condiciones del neurodesarrollo o enfermedades crónicas, con el fin de determinar con mayor precisión la especificidad del marcador para la enfermedad o proceso en estudio.



# Capítulo 3.

Modulación del microbioma  
intestinal con psicobióticos

## CAPÍTULO III: MODULACIÓN DEL MICROBIOMA INTESTINAL CON PSICOBÍOTICOS

### I. ANTECEDENTES

La intervención clínica en niños con TEA requiere enfoques integrales que aborden no solo los aspectos neuroconductuales, sino también factores sistémicos como la salud gastrointestinal. Debido a su etiología multifactorial, a la heterogeneidad clínica de sus manifestaciones, y al desconocimiento de su etiología; actualmente no existen tratamientos con finalidad de curación. El uso de antibióticos como la vancomicina por vía oral ha mostrado mejoras conductuales temporales en niños con TEA; sin embargo, dichos efectos beneficiosos cesan al suspender la terapia, y su uso prolongado no se justifica desde el punto de vista clínico (308). Por ello, el interés se ha desplazado hacia alternativas más sostenibles y seguras centradas en el restablecimiento del equilibrio microbiano durante ventanas críticas del desarrollo, como los tratamientos con prebióticos, probióticos y simbióticos, que representan un enfoque terapéutico emergente con alto potencial (48).

En los últimos años se han introducido los psicobióticos, a los que podemos definir como microorganismos vivos que, cuando se ingieren en cantidades adecuadas, pueden producir un beneficio para la salud mental (73). El interés en estas sustancias ha crecido notablemente, impulsando su producción y comercialización por parte de la industria farmacéutica. Para garantizar su efectividad y seguridad, deben cumplir una serie de características. Al igual que ocurre con los probióticos, las propiedades beneficiosas son específicas de cepa, por lo que los efectos no deberían extrapolarse entre diferentes formulaciones probióticas. Además, la concentración de bacterias vivas es un parámetro crítico; la mayoría de los productos comercializados contienen al menos  $1,5 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por cápsula, pudiendo oscilar entre  $4 \times 10^9$  y  $3 \times 10^{10}$  (76).

A pesar de su potencial, el uso de psicobióticos presenta varios desafíos. Persisten dudas sobre su mecanismo de acción completo, la duración óptima del tratamiento, la posología adecuada y los posibles efectos a largo plazo. En muchos casos, los efectos beneficiosos desaparecen poco después de suspender el tratamiento. Además, otros

factores externos como la dieta, el género o la edad del paciente podrían influir en su eficacia. Un aspecto preocupante es la falta de regulación del mercado de los probióticos, donde se comercializan productos para diversas afecciones sin contar con evidencia clínica robusta. Finalmente, se destaca la escasez de estudios prospectivos a largo plazo y de ensayos clínicos controlados que utilicen metodologías estandarizadas para medir la efectividad y seguridad, tanto a nivel clínico como en términos de análisis del microbioma.

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A pesar del creciente interés en incorporar los probióticos como parte del abordaje terapéutico en el TEA, su uso clínico aún no está justificado debido a la escasez de estudios prospectivos a largo plazo y de ensayos clínicos controlados que utilicen metodologías estandarizadas para evaluar su eficacia y seguridad. Esta limitación se extiende tanto a nivel clínico como al análisis del microbioma intestinal. Una de las estrategias para fortalecer la evidencia científica en este campo consiste en realizar estudios longitudinales que analicen la composición microbiana antes y después de la intervención probiótica. En este capítulo se presenta un caso clínico pediátrico en el que se evalúa el perfil del microbioma intestinal, así como la producción de metabolitos microbianos y neurotransmisores, antes y después de la administración de probióticos.

El **OBJETIVO** fue conocer el impacto real del psicobiótico en el microbioma intestinal, sobre todo en su funcionalidad, en relación con los datos clínicos.

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se seleccionó un niño de 7 años, diagnosticado con TEA por los criterios del DSM-V, del que se disponía de dos muestras de heces: antes del inicio de la intervención con psicobióticos y al finalizar la misma. Su incorporación en el estudio fue autorizada por sus padres y se realizó de forma voluntaria. Las características demográficas y clínicas del caso fueron recopiladas a partir de su historia médica, garantizando la confidencialidad mediante la inclusión de los datos en una base de datos anonimizada.

El estudio fue autorizado por el Comité de Ética del Hospital Gregorio Marañón con el código PI23/00747.

---

## 2. PROTOCOLO DE INTERVENCIÓN PROBIÓTICO

El protocolo de intervención se llevó a cabo mediante la administración oral de productos probióticos y psicobióticos comercializados por el laboratorio Bromatech® (Italia), distribuidos en dos fases:

### Fase 1: Intervención inicial (12 días)

- Producto: *Enterelle Plus*® (probiótico).
- Dosis: 1 cápsula al día (1-0-0).
- Composición: La formulación contiene una mezcla de cepas probióticas de *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* MTCC5375 (<10<sup>9</sup> UFC), *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* SP92 (<10<sup>9</sup> UFC), *Lactobacillus acidophilus* LA14 (10<sup>9</sup> UFC), *Enterococcus faecium* UBEF41 (<10<sup>9</sup> UFC).

### Fase 2: Intervención de mantenimiento (3 meses)

- Producto 1: Serobioma® (simbiótico).
  - Dosis: 1 cápsula/día (0-1-0).
  - Composición: la formulación contiene cepas probióticas [*Lactobacillus rhamnosus* LR32, (<10<sup>9</sup> UFC), *Bifidobacterium lactis* BL04, (10<sup>9</sup> UFC), *Bifidobacterium longum* BB536 (<10<sup>9</sup> UFC)] y componente prebiótico (almidón resistente) junto con los aminoácidos L-teanina (100 mg/cápsula) y L-cistina (50 mg/ cápsula), y riboflavina (vitamina B2, 0,7 mg/ cápsula).
- Producto 2: Psicobrain® (psicobiótico).
  - Dosis: 2 cápsulas/día (1-0-1).
  - Composición: Su formulación combina cepas bacterianas psicobióticas *L. rhamnosus* HN001 (10<sup>9</sup> UFC), *L. rhamnosus* SP1 (<10<sup>9</sup> UFC), *Lactobacillus acidophilus* LA1 (<10<sup>9</sup> UFC), *Lactobacillus reuteri* LR92 (<10<sup>9</sup> UFC) con extracto de *Eschscholzia californica* (25 mg/ cápsula), L-teanina (25 mg/ cápsula) y vitamina C (12 mg/ cápsula).

---

### 3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y SECUENCIACIÓN

Tras la recepción en el laboratorio, las muestras de heces fueron inmediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas, sin añadir ningún tipo de preservante. Para realizar la técnica de transcriptómica, primero se descongelaron despacio las alícuotas (24 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  y 24h a  $4^{\circ}\text{C}$ ) y se solubilizaron 2 mg de heces en 5 mL de agua estéril, empleando 0,5 mL de esta solución para obtener ácido ribonucleico (ARN) total utilizando el QIAGEN RNeasy PowerMicrobiome Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), que elimina por completo el ARN humano y el de los ribosomas bacterianos, dejando sólo lo que los microorganismos están expresando. Una vez obtenido el ARN, se determinó su concentración y calidad mediante un fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), se fragmentó, y se pasó a cADN, realizándose la secuenciación masiva en una plataforma MiSeq (Illumina, San Diego CA, EE.UU.) en la UCA-GT y Bioinformática del IRYCIS (<https://www.irykis.org/es/servicios/11/genomica-traslacional-y-bioinformatica>).

---

### 4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO

El paso de filtrado de las lecturas de secuenciación se realizó con el programa Kneaddata (Huttenhower Lab, s.f.), que aplica un filtro de calidad utilizando los parámetros predeterminados de Trimmomatic (309) y elimina las secuencias que se mapean contra el genoma humano, el transcriptoma humano y ARN ribosomal con las bases de datos Bowtie2 (310) y kneaddata default. Se realizó el análisis de las lecturas con SqueezeMeta v1.6.3, septiembre 2023 en modo «coassembly» (311), y el ensamblaje con rnaSPAdes (312). Los contigs cortos (menos de 200 bps) se eliminaron utilizando prinseq (313). La identidad de los ARNs se predijo con Barrnap (314), las secuencias de ARNt/ARNtm con Aragorn (315) y para los ORF con Prodigal (316). Las búsquedas de similitud para GenBank (317) o para KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (318), se realizaron utilizando Diamond (319). El mapeo de lecturas contra contigs se realizó utilizando Bowtie2 (310). El análisis posterior y la inspección de los resultados se realizó con el paquete SQMTools R (320). Para evaluar los cambios funcionales en el microbioma intestinal tras el tratamiento probiótico y psicobiótico, se realizó un análisis metatranscriptómico basado en KEGG en las abundancias de transcripción para KEGG Orthologs (KOs) cuantificadas utilizando los transcriptos por millón (TPM) que se

obtuvieron de la salida de SqueezeMeta, y después se calcularon los cambios de pliegue  $\log_2$ .

#### IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos con el estudio transcriptómico hacen referencia exclusivamente a las especies activas, ya que solo se secuencian las moléculas de ARN que han sido sintetizadas por los genes activos. Por ello, no se puede valorar la abundancia de taxones como ocurre con la metagenómica.

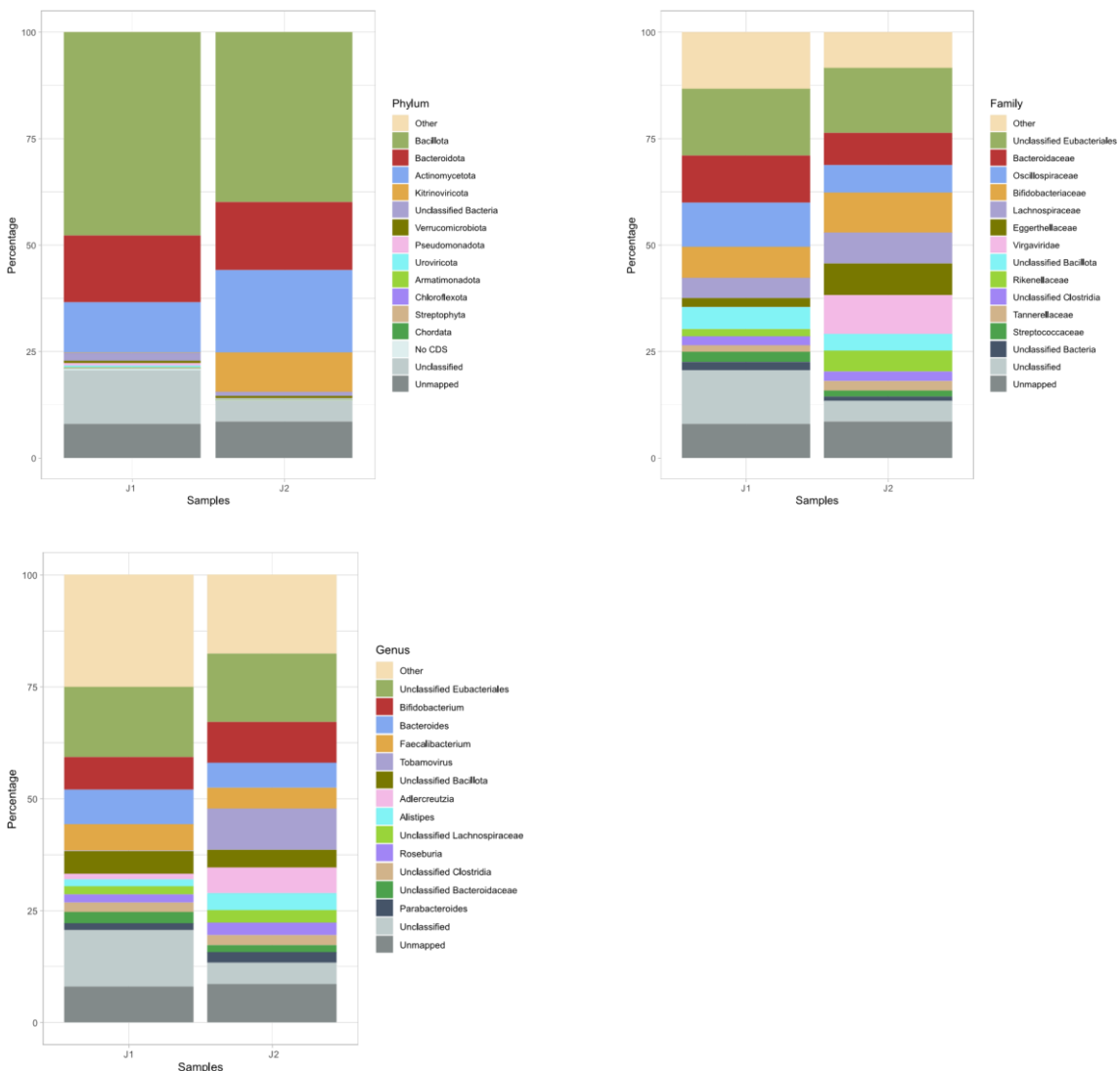
El perfil metatranscriptómico de las muestras fecales reveló cambios en la composición y la actividad de la microbiota intestinal, aunque estos cambios no fueron drásticos. A nivel de filos, en la muestra basal la comunidad estaba dominada por Bacillota, Bacteroidota y Actinomycetota. Tras el tratamiento, Actinomycetota mostró un aumento pronunciado, pasando de 9,5 millones de TPM y representando el 15% del ecosistema a 21 millones de TPM y 25% de abundancia. Este hecho puede ser debido a la ingesta de bifidobacterias lo que sugiere que la bacteria está activa en el intestino probablemente tras colonizar el intestino. También destaca el aumento del phylum Kitrinoviricota, el cual corresponde a virus ARN, específicamente al género *Tobamovirus*, el conocido como virus del mosaico del tomate, y cuya presencia se puede deber a la ingesta de este alimento (Figura 15).

En cuanto a los géneros, las diferencias no fueron significativas, al comparar ambas muestras, destacando el aumento de *Collinsella aerofaciens*, de 2.882.348 TPM (3,57%) a 10.030.553 TPM (9,23%), y de *Faecalibacterium prausnitzii*, de 4.502.700 TPM (5,56%) a 8.460.132 TPM (7,78%) tras la exposición a los probióticos/psicobióticos, y por supuesto el virus del tomate.

A continuación, nos centramos en los cambios de las bacterias presentes en los productos que se correspondían con las especies *L. rhamnosus*, *B. longum*, *B. lactis*, *S. boulardii*, *E. faecium* y *L. acidophilus*. En línea con los resultados anteriores, sólo se detectaron cambios relevantes en *B. longum*, que pasó de 2.774.540 TPM (3,45%) en la muestra basal a 5.599.801 TPM (5,16%) postratamiento, lo que indica una respuesta positiva al psicobiótico administrado. Por el contrario, *L. rhamnosus* se mantuvo en

niveles de expresión bajos, disminuyendo ligeramente de 262 TPM (0,0003%) a 211 TPM (0,0002%).

Por el contrario, el tratamiento produjo una disminución en *B. fragilis*, de 1.774.693 TPM (2,23%) a 392.987 TPM (0,36%). Otros taxones que mostraron disminuciones sustanciales fueron *Alistipes putredinis* (de 1.306.718 TPM [1,63%] a 462.202 TPM [0,43%]) y *B. uniformis* (de 1.334.095 TPM [1,67%] a 508.899 TPM [0,47%]) (Figura 16).



**Figura 15.** Comparación de abundancias relativas de la expresión de los distintos órdenes taxonómicos bacterianos (filo, familia y género) comparando la muestra basal y tras tratamiento con el psicobiótico.

Más allá de la composición, la ventaja que aporta la transcriptómica es poder analizar cambios funcionales al poder asignar funciones a los ARN secuenciados. En el conjunto de datos metatranscriptómicos se detectó un total de 6.416 entradas KO. Para minimizar el sesgo interpretativo derivado de los umbrales técnicos de detección, se excluyeron las entradas KO con un valor TPM de cero en cualquiera de las muestras, conservando 5.433 KO expresadas activamente para el análisis comparativo. Este enfoque de filtrado garantizó que el análisis se centrara en la modulación transcripcional entre las funciones detectadas, aunque puede infrarrepresentar interruptores reguladores *on/off* biológicamente relevantes en los que la expresión es completamente inducida o suprimida.

Para caracterizar la síntesis a nivel de ruta de los datos de expresión metatranscriptómica se realizaron los siguientes pasos: Los resultados de cambio de  $\log_2$  (LFC) para KOs medidos en TPM, antes y después del tratamiento, se fusionaron primero con un archivo de anotación de KO a vía que contenía mapeos de vías curados manualmente (basados en la clasificación KEGG). Las asignaciones de múltiples vías se ampliaron para garantizar que cada MD contribuyera a todas las vías relevantes. Para cada vía, se calculó el TPM medio antes y después del tratamiento, el  $\log_2$ FC medio, el cambio absoluto total en el TPM y el número de KO únicos detectados. Las vías se clasificaron además como ascendentes, descendentes o estables en función de los umbrales  $\log_2$ FC medios (ascendente:  $\geq 1$ , descendente:  $\leq -1$ , estable: entre -1 y 1). Todos los pasos se implementaron utilizando Python.

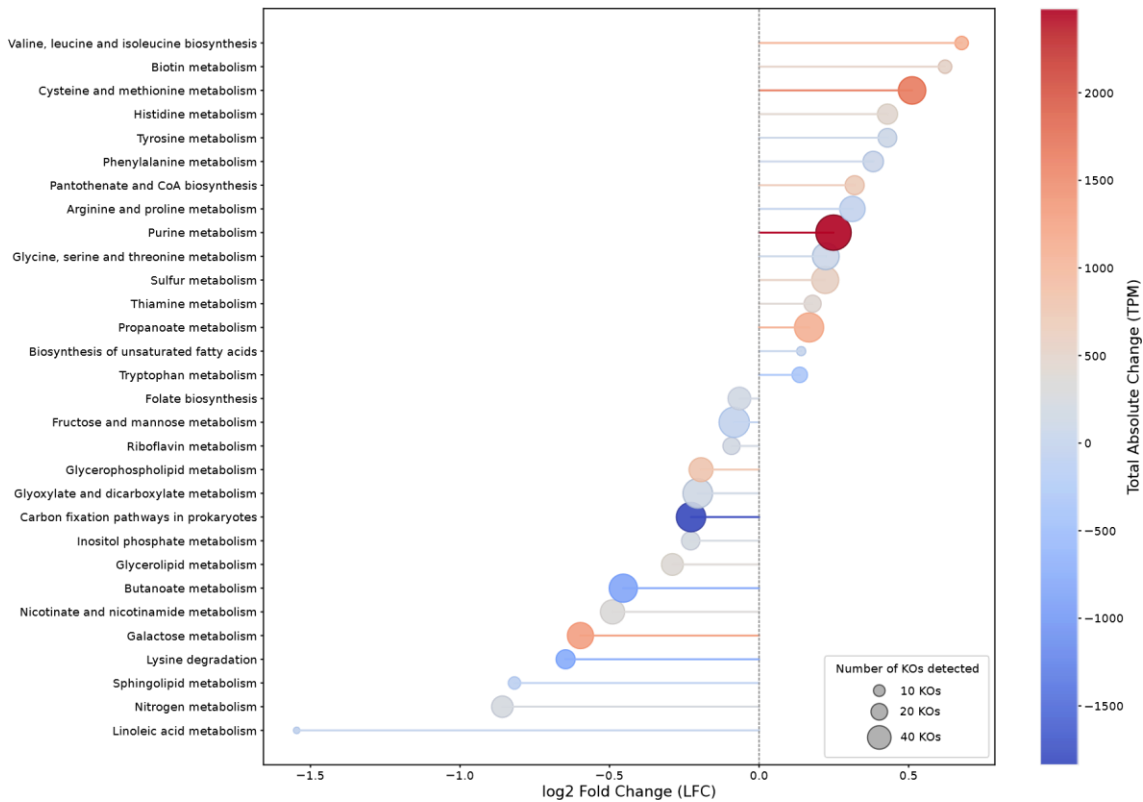
En cuanto a las vías metabólicas KEGG bacterianas, los datos sugieren cambios modestos de forma general. El metabolismo de los glicerofosfolípidos, de las purinas y del butanoato, no eran muy abundantes en la muestra basal, sus cambios en la abundancia total absoluta se mantuvieron dentro de un rango relativamente bajo a intermedio (menos que 1.500 TPM). Sorprendentemente, el metabolismo de las purinas y de los glicerofosfolípidos implicaron un número comparativamente mayor tras el tratamiento, lo que apoya la fiabilidad de estas observaciones, sin embargo, la magnitud del cambio no indica una reestructuración metabólica drástica.

Del mismo modo, el metabolismo de los esfingolípidos y el metabolismo del glioxilato y el dicarboxilato mostraron cambios perceptibles, pero implicaron menos KO poco abundantes, lo que exige una interpretación cautelosa.

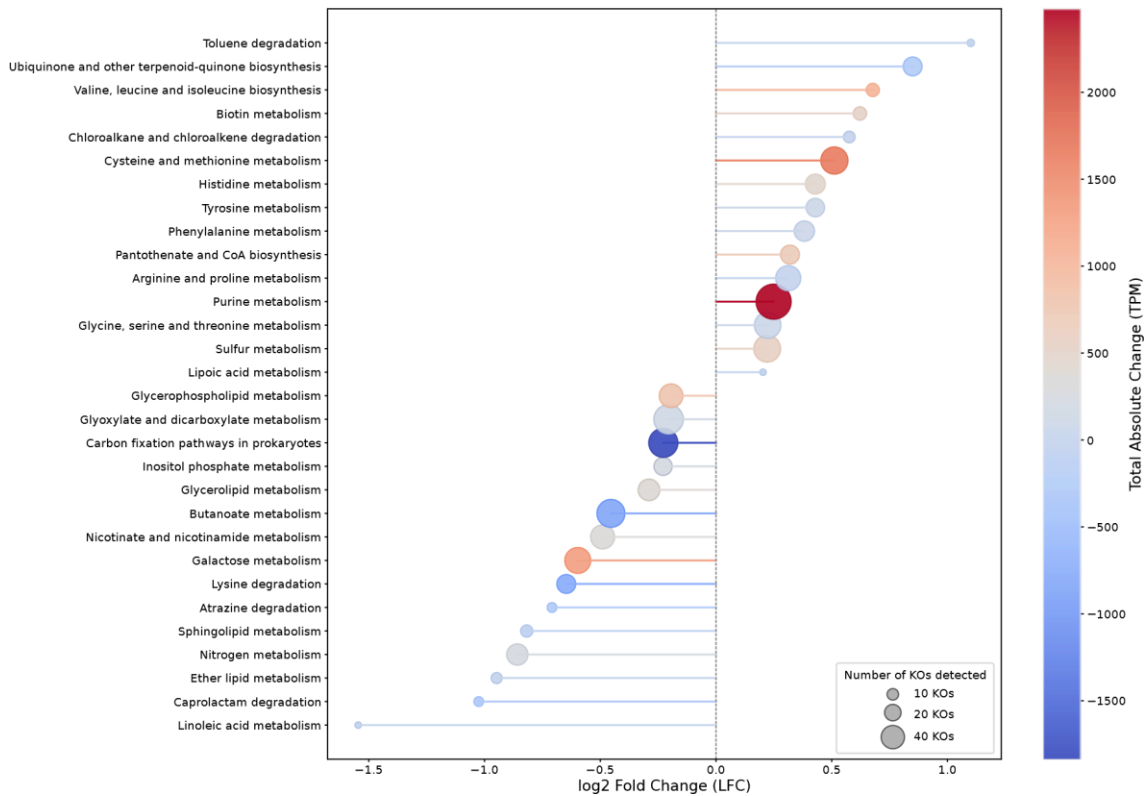
Por el contrario, las rutas metabólicas centrales como la glucólisis/gluconeogénesis o el ciclo TCA no sufrieron cambios relevantes, lo que sugiere estabilidad metabólica a un nivel funcional amplio. Además, varias vías del metabolismo de los aminoácidos (metabolismo del triptófano, la fenilalanina y la tirosina, entre otros) expresión detectable y una modulación menor en los niveles transcripcionales, aunque los cambios no fueron pronunciados en términos de abundancia o de proporción. Del mismo modo, las vías de biosíntesis de vitaminas y cofactores, como el metabolismo de la riboflavina, el folato y el pantotenato, se expresaron de forma constante sin cambios reseñables.

Las vías asociadas con el procesamiento ambiental, la degradación de xenobióticos y la biosíntesis de metabolitos secundarios presentaron una actividad transcripcional baja o estaban ausentes del conjunto de datos detectado, lo que sugiere que estas funciones no se vieron sustancialmente influidas por la intervención probiótica en este contexto.

En general, el conjunto de datos refleja modulaciones matizadas y específicas de las vías en la actividad metabólica ([Figura 16](#)), en ninguna de las categorías funcionales se observaron cambios globales drásticos, y los resultados deben interpretarse con cautela debido a la escala moderada de los cambios y la variación en la representación de KO en las vías.



**Figura 16. Actividad diferencial de las rutas metabólicas bacterianas.** Gráfico de piruleta que muestra los cambios en las vías metabólicas KEGG en función del LFC en la abundancia de transcritos (TPM). Las rutas están ordenadas por LFC, y el tamaño de cada piruleta representa el número de ortólogos KEGG (KOs) detectados en cada ruta. Los valores positivos de LFC indican una regulación al alza en la muestra posterior al probiótico, mientras que los valores negativos indican una regulación a la baja. El cambio transcriptómico absoluto total se muestra en el eje térmico.



**Figura 17. Actividad diferencial de las vías metabólicas bacterianas (metabolismo secundario también incluido).** Gráfico de piruletas que muestra los cambios en las rutas metabólicas KEGG en función del LFC en la abundancia de TPM. Las rutas están ordenadas por LFC, y el tamaño de cada piruleta representa el número de KOs detectados en cada ruta. Los valores positivos de LFC indican una regulación al alza en la muestra posterior al probiótico, mientras que los valores negativos indican una regulación a la baja. El cambio transcriptómico absoluto total se muestra en el eje térmico.

Examinamos las entradas KO más abundantes en cada muestra para destacar las funciones metabólicas dominantes en el microbioma intestinal antes y después del tratamiento psicobiótico. Antes del tratamiento, lo más activo eran funciones/enzimas metabólicas y de mantenimiento del núcleo implicadas en la glucólisis, el ciclo de Krebs, la síntesis de nucleótidos y el metabolismo de aminoácidos.

**Tabla 4. KEGGs mayoritarios en la muestra de heces basal y sus funciones.**

KEGG ID	Gen	Función
K06421	<i>sspD</i>	Pequeña proteína D ácido-soluble, presente en bacterias formadoras de esporas; protege el ADN durante la esporulación.
K04043	<i>dnaK</i> (Hsp70)	Chaperona implicada en el plegamiento de proteínas, la degradación del ARN y la respuesta al estrés; participa en vías como la degradación del ARN (map03018).
K06418	<i>sspA</i>	Pequeña proteína A soluble en ácido, típica de las esporas bacterianas; protege el ADN contra la desecación y el estrés.
K03088	<i>rpoE</i>	Factor sigma (subfamilia ECF) de la ARN polimerasa; regula los genes que responden al estrés extrínseco.
K04564	<i>SOD2</i>	Fe-Mn superóxido dismutasa [EC:1.15.1.1]; convierte los radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Presente en las vías de señalización MAPK, longevidad y peroxisomas.
K04077	<i>groEL</i> (HSP60)	Chaperonina esencial para el correcto plegamiento de las proteínas; también interviene en la degradación del ARN.
K13993	HSP20	Pequeña proteína de choque térmico (20 kDa); actúa como chaperona en el procesamiento de proteínas.
K01689	<i>eno</i> (enolase)	Enzima glucolítica [EC:4.2.1.11]; cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato, paso final de la glucólisis.
K03695	<i>clpB</i>	Subunidad de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP.
K02358	<i>Tuf</i>	Factor de elongación Tu; interviene en la síntesis de proteínas
K00134	<i>gapA</i>	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (fosforilante) [EC:1.2.1.12]
K02355	<i>fusA</i>	Factor de elongación G
K06399	<i>spoIVB</i>	proteína B de esporulación de estadio IV [EC:3.4.21.116]
K03286	OmpA-OmpF	Señalización y procesos celulares (transportadores)

**Tabla 5. KEGGs mayoritarios en la muestra recogida tras el tratamiento psicobiótico y sus funciones.**

KEGG ID	Gen	Función
K02355	<i>fusA</i>	Factor de elongación G; participa en la síntesis de proteínas.
K04043	<i>dnaK</i> (Hsp70)	Chaperona molecular implicada en el plegamiento de proteínas, la degradación del ARN y la respuesta al estrés; participa en vías como la degradación del ARN (map03018).
K03695	<i>clpB</i>	Subunidad de unión a ATP de la proteasa Clp dependiente de ATP; participa en el control de calidad de las proteínas y en la respuesta al estrés.
K06421	<i>sspD</i>	Pequeña proteína D soluble en ácido de la espora; protege el ADN durante la esporulación.
K02358	<i>Tuf</i>	Factor de elongación Tu; interviene en la síntesis de proteínas.
K03088	<i>rpoE</i>	Factor sigma-70 de la ARN polimerasa, subfamilia ECF; regula los genes que responden al estrés extrínseco.
K04077	<i>groEL</i>	Chaperona molecular implicada en el plegamiento de proteínas.
K02003	–	Proteína de unión a ATP del sistema de transporte ABC putativo; función desconocida.
K02004	–	Proteína permeasa putativa del sistema de transporte ABC; función desconocida.
K03687	GRPE	Chaperona GrpE.
K21077	–	Poliproteína 1ab de la replicasa de closterovirus.
K03043	<i>rpoB</i>	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN [EC:2.7.7.6]
K02027	–	Proteína de unión a sustrato del sistema de transporte de azúcares múltiples.
K03046	<i>rpoC</i>	Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN [EC:2.7.7.6].

Tras el tratamiento, varias KO mostraron una regulación al alza, siendo los aumentos más destacados los observados en K02064 ( $\log_2FC = +7,90$ ; basal: 0,014, postratamiento: 3,33), K08247 (+7,84) y K09770 (+7,52). Por el contrario, las funciones más fuertemente reguladas a la baja incluyeron K10354 ( $\log_2FC = 10,01$ ; basal: 10,72, postratamiento: 0,01), K12314 (8,54) y K12437 (7,37), lo que indica una supresión sustancial de vías específicas. Los mayores cambios absolutos de expresión, indicativos de una reprogramación metabólica importante, se encontraron en K06421 (proteína similar a la glucosiltransferasa, caída de 58,421 a 5,892 TPM,  $\log_2FC = 3,31$ ), lo que sugiere una regulación a la baja de las funciones de ensamblaje de glicanos. K04043 y K03695 también mostraron una elevación tras el tratamiento, lo que sugiere un aumento de las funciones relacionadas con el estrés oxidativo o la señalización. A pesar de los cambios observados, se evidenció que el núcleo funcional del microbioma estaba conservado. Un total de 218 KOs permanecieron altamente expresados (5% superior) en ambas condiciones, apoyando la estabilidad funcional en procesos metabólicos clave.

## V. DISCUSIÓN

Este estudio piloto de intervención con probióticos en un niño de 7 años diagnosticado con TEA exploró los cambios en la microbiota intestinal a nivel taxonómico y funcional, así como las posibles repercusiones clínicas en los síntomas gastrointestinales y conductuales. Para ello, se aplicó un análisis metatranscriptómico de alta resolución, basado en la extracción y secuenciación del ARN total bacteriano, lo que permitió evaluar no sólo la composición microbiana, sino también la actividad metabólica del ecosistema intestinal antes y después de la intervención.

A diferencia de los estudios basados únicamente en ADN 16S, la metodología aplicada en este trabajo permitió un análisis más profundo de la funcionalidad activa del microbioma mediante cuantificación de TPM y mapeo contra bases de datos funcionales como KEGG. Esta aproximación ofreció una perspectiva más precisa del impacto real de los psicobióticos administrados (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* y *B. longum*, entre otros) sobre el ecosistema intestinal.

Aunque no se detectaron cambios drásticos en la estructura global del microbioma intestinal, hallazgo congruente con estudios previos que señalan la alta variabilidad

interindividual en la respuesta a la suplementación probiótica, especialmente en poblaciones pediátricas con TEA, los análisis metatranscriptómicos sí revelaron un aumento significativo en la expresión de genes asociados al metabolismo del butirato. Este hallazgo se relaciona con la mayor abundancia de especies como *F. prausnitzii* y *Bifidobacterium* spp., ambas reconocidas por su capacidad de producir metabolitos con efectos inmunomoduladores y beneficios sobre la barrera intestinal (247,321). El incremento en la actividad transcripcional de rutas funcionales implicadas en la producción de butirato sugiere que, aunque la diversidad bacteriana no haya variado sustancialmente, sí hubo una modulación metabólica activa inducida por la suplementación probiótica. Este fenómeno podría tener importantes repercusiones clínicas, ya que el butirato no solo contribuye a la integridad epitelial, sino que también actúa sobre el sistema nervioso entérico y central a través del eje intestino-cerebro (132).

El aumento significativo en los recuentos de *Bifidobacterium* spp., sugiere una posible colonización transitoria o activación de cepas endógenas. Este resultado coincide con investigaciones previas (65) que han documentado incrementos similares en niños con TEA tras la administración de probióticos. Si bien no puede descartarse por completo una reactivación de bifidobacterias preexistentes, la magnitud del cambio y su persistencia temporal apuntan a una colonización, al menos parcial, de las cepas administradas.

En cuanto al aumento en la abundancia de *F. prausnitzii*, una bacteria comensal intestinal reconocida por su rol antiinflamatorio, cabe destacar su relevancia clínica. Esta especie, productora de butirato y sensible al oxígeno, ha sido asociada con una mejora de la función de barrera epitelial y con efectos inmunomoduladores significativos (321–323). Además, su abundancia parece correlacionarse negativamente con la severidad de los síntomas de TEA, especialmente en niños mayores de tres años (324). Estos datos sugieren que la intervención pudo haber promovido un entorno intestinal más antiinflamatorio, con potencial para contribuir indirectamente a mejoras clínicas.

En consonancia con lo anterior, durante la intervención se observó una mejora clínica significativa en los síntomas gastrointestinales, concordante con otros estudios

que han reportado beneficios similares en parámetros como el estreñimiento, la consistencia de las heces, flatulencias y dolor abdominal (65,70,325). Algunos autores han sugerido que la mejoría en los síntomas digestivos podría correlacionarse con una atenuación de la sintomatología autista (65), posiblemente a través de mecanismos mediados por metabolitos bacterianos, como el butirato, el GABA o el triptófano, que pueden influir en la neurotransmisión.

En cuanto al impacto sobre los síntomas conductuales, se observaron indicios de mejoría, aunque de carácter parcial. La literatura científica muestra resultados mixtos en este ámbito. Algunos estudios han reportado mejoras significativas tras intervenciones con combinaciones similares de probióticos (64–66,68,326), mientras que otros no han hallado diferencias relevantes (69,71). Esta heterogeneidad puede explicarse por múltiples factores: el estado basal del microbioma del paciente, las herramientas empleadas para la evaluación clínica, la duración del tratamiento o las características específicas de las cepas utilizadas.

Cabe señalar que la suplementación con múltiples cepas probióticas parece ofrecer ventajas sobre el uso de cepas individuales (327), probablemente debido a los efectos sinérgicos y a la interacción entre sus metabolitos, lo que amplifica la acción neuromoduladora sobre el eje intestino-cerebro. Estos mecanismos aún requieren ser mejor comprendidos mediante estudios de diseño robusto y con análisis funcionales avanzados.

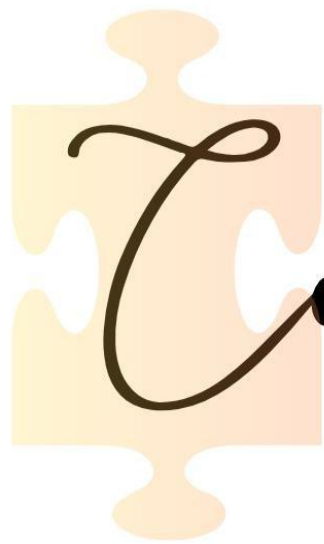
No obstante, las mejoras clínicas observadas durante la intervención fueron transitorias y revirtieron tras su finalización, incluyendo una reducción en la conexión visual, un aspecto típico del fenotipo autista. Esta reversibilidad puede explicarse por la naturaleza transitoria de la colonización probiótica, la ausencia de mantenimiento de la intervención, o la necesidad de un periodo más prolongado de administración para inducir cambios estables en el microbioma y sus funciones neuromoduladoras. Se ha propuesto que un mínimo de tres meses constituye un umbral eficaz para intervenciones probióticas (327), siendo plausible que tratamientos de mayor duración generen efectos más robustos y sostenibles.

La edad del participante constituye un aspecto relevante, ya que se encuentra en una etapa de neurodesarrollo aún flexible, lo que favorece la posibilidad de modulación conductual y funcional. Diversas investigaciones han demostrado que las intervenciones tempranas en TEA conducen a mejores resultados clínicos (328,329), siendo coherente con el planteamiento de este trabajo.

Desde un punto de vista metodológico, una de las fortalezas principales del presente estudio reside en el uso de una técnica de análisis metatranscriptómico avanzada, que incluyó la eliminación de ARN humano y ribosomal, permitiendo así enfocarse exclusivamente en la actividad funcional del microbioma bacteriano. El uso de herramientas bioinformáticas robustas como SqueezeMeta, rnaspades y SQMTools garantizó un procesamiento profundo y fiable de los datos, asegurando alta precisión en la detección de cambios funcionales.

Pese a la limitación de tratarse de un único sujeto, este estudio ofrece una valiosa contribución al evidenciar que incluso en un caso individual pueden observarse cambios funcionales concretos en bacterias clave del ecosistema intestinal, asociadas con efectos inmunomoduladores y neurológicos. Si bien los resultados deben interpretarse con prudencia al tratarse de un único sujeto, el estudio puede considerarse un proyecto piloto prometedor que puede servir como base para futuras investigaciones con muestras más amplias y diseños controlados. Estudios como el de Liu *et al.* 2019, con metodología sólida y poblaciones más representativas, podrían beneficiarse de replicar enfoques metatranscriptómicos como el utilizado en este trabajo.





Conclusiones

## CONCLUSIONES

**Primera.** El modelo de *D. melanogaster* es una herramienta experimental adecuada para el estudio de procesos neurobiológicos tempranos asociados al TEA, a partir de la exposición a microbiota fecal de donantes con dicho diagnóstico, aportando un nuevo enfoque funcional para investigar el eje microbiota-intestino-cerebro.

**Segunda.** En el modelo de *D. melanogaster*, la microbiota intestinal aislada de niños con TEA modula los procesos neurobiológicos tempranos, particularmente la sinaptogénesis. Una adquisición secuencial de la microbiota en las etapas tempranas del desarrollo contribuye al establecimiento adecuado de los circuitos neuronales.

**Tercera.** Los efectos observados con la microbiota completa no se replicaron con bacterias aisladas, lo que demuestra la complejidad del ecosistema y de sus metabolitos en la modulación del eje intestino-cerebro.

**Cuarta.** Existe una relación dosis-dependiente entre la microbiota y la funcionalidad del sistema nervioso en la respuesta sináptica, lo que debería ser contemplado en futuros estudios.

**Quinta.** La evidencia disponible justifica la incorporación de la detección sistemática de *p*-cresol como biomarcador en orina en personas con TEA. Este marcador es fácil de determinar y sugerimos su monitorización continua para evaluar los cambios en la microbiota.

**Sexta.** La incorporación de biomarcadores pronósticos asociados a la microbiota intestinal en el TEA resulta clave para avanzar en la detección temprana y contribuir al diseño de estrategias que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

**Séptima.** Es necesario una estandarización metodológica y la definición de los rangos de normalidad de la composición y la funcionalidad de la microbiota para poder comparar resultados entre poblaciones.

**Octava.** La intervención con probióticos con propiedades psicobióticas en un niño con TEA indujo cambios funcionales en su microbiota intestinal a la par que una notable mejoría clínica en los síntomas gastrointestinales y conductuales. Los cambios clínicos fueron transitorios, probablemente tras la estabilización de los cambios en la microbiota. La microbiota intestinal es un ecosistema resiliente con capacidad de tamponar los efectos producidos por intervenciones puntuales como es la ingesta de probióticos.

**Novena.** La evidencia acumulada parece indicar que la microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la regulación del desarrollo neurológico, actuando como un modulador clave del eje microbiota-intestino-cerebro. Sin embargo, a pesar de los avances significativos aún es necesario contar con mayor evidencia científica que detalle los mecanismos precisos mediante los cuales ambos ecosistemas se comunican y afectan la función cerebral. El entendimiento profundo de estos mecanismos es crucial para identificar objetivos terapéuticos específicos y desarrollar intervenciones efectivas que modulen la microbiota con el fin de promover un desarrollo neurobiológico saludable.

**Décima.** La investigación futura debe centrarse en delinear las vías moleculares, celulares y metabólicas involucradas, para así avanzar hacia enfoques terapéuticos basados en la modulación del microbioma que puedan prevenir o tratar trastornos del neurodesarrollo como el TEA.





# Referencias

## REFERENCIAS

1. Fuentes J, Hervás A, Howlin P, (ESCAP ASD Working Party). ESCAP practice guidance for autism: a summary of evidence-based recommendations for diagnosis and treatment. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 1 de junio de 2021;30(6):961-84.
2. Trevisan DA, Foss-Feig JH, Naples AJ, Srihari V, Anticevic A, McPartland JC. Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Are Better Differentiated by Positive Symptoms Than Negative Symptoms. *Front Psychiatry* [Internet]. 11 de junio de 2020 [citado 5 de mayo de 2025];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/https://www.frontiersin.org/journals/psychiatry/articles/10.3389/fpsy.2020.00548/full>
3. Rosen NE, Lord C, Volkmar FR. The Diagnosis of Autism: From Kanner to DSM-III to DSM-5 and Beyond. *J Autism Dev Disord*. 1 de diciembre de 2021;51(12):4253-70.
4. Silverstein SM. Jung's views on causes and treatments of schizophrenia in light of current trends in cognitive neuroscience and psychotherapy research I. Aetiology and phenomenology. *Journal of Analytical Psychology*. 2014;59(1):98-129.
5. Sher DA, Gibson JL. Pioneering, prodigious and perspicacious: Grunya Efimovna Sukhareva's life and contribution to conceptualising autism and schizophrenia. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 1 de marzo de 2023;32(3):475-90.
6. Artigas-Pallares J, Paula I. El autismo 70 años después de Leo Kanner y Hans Asperger. *Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría*. septiembre de 2012;32(115):567-87.
7. American Psychiatric Association, editor. Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2014. 438 p.
8. Frith U, Happé F. Autism spectrum disorder. *Current Biology*. 11 de octubre de 2005;15(19):R786-90.
9. Shaw KA, Williams S, Patrick ME, Valencia-Prado M, Durkin MS, Howerton EM, *et al*. Prevalence and Early Identification of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 and 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 16 Sites, United States, 2022. *MMWR Surveill Summ*. 17 de abril de 2025;74(2):1-22.
10. Fortea Sevilla MS, Escandell Bermúdez MO, Castro Sánchez JJ. [Estimated prevalence of autism spectrum disorders in the Canary Islands]. *An Pediatr (Barc)*. diciembre de 2013;79(6):352-9.
11. Kamp-Becker I. Autism spectrum disorder in ICD-11—a critical reflection of its possible impact on clinical practice and research. *Mol Psychiatry*. 1 de marzo de 2024;29(3):633-8.
12. Zeidan J, Fombonne E, Scorch J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, *et al*. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research*. mayo de 2022;15(5):778-90.
13. Kopec AM, Fiorentino MR, Bilbo SD. Gut-immune-brain dysfunction in Autism: Importance of sex. *Brain Res*. 15 de agosto de 2018;1693(Pt B):214-7.
14. Dickerson AS, Rotem RS, Christian MA, Nguyen VT, Specht AJ. Potential Sex Differences Relative to Autism Spectrum Disorder and Metals. *Curr Envir Health Rpt*. 1 de diciembre de 2017;4(4):405-14.
15. Ratto AB, Kenworthy L, Yerys BE, Bascom J, Wieckowski AT, White SW, *et al*. What About the Girls? Sex-Based Differences in Autistic Traits and Adaptive Skills. *J Autism Dev Disord*. mayo de 2018;48(5):1698-711.
16. Mezzelani A, Landini M, Facchiano F, Raggi ME, Villa L, Molteni M, *et al*. Environment, dysbiosis, immunity and sex-specific susceptibility: A translational hypothesis for regressive autism pathogenesis. *Nutritional Neuroscience*. mayo de 2015;18(4):145-61.
17. Maenner MJ. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveill Summ* [Internet]. 2023 [citado 25 de abril de 2023];72. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/72/ss/ss7202a1.htm>
18. The Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Europe | IntechOpen [Internet]. [citado 25 de junio de 2025]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/84388>
19. García Primo P, Santos Borbujo J, Martín Cilleros MV, Martínez Velarte M, Lleras Muñoz S, Posada de la Paz M, *et al*. Programa de detección precoz de trastornos generalizados del desarrollo en las áreas de salud de Salamanca y Zamora. *Anales de Pediatría*. 1 de mayo de 2014;80(5):285-92.

20. Lirola FV. Evolución del trastorno del espectro autista en Almería: prevalencia e incidencia por sexos, comorbilidad y distribución municipal. *Revista CENTRA de Ciencias Sociales*. 21 de junio de 2022;103-32.
21. Pérez-Crespo L, Prats-Urbe A, Tobias A, Duran-Tauleria E, Coronado R, Hervás A, *et al.* Temporal and Geographical Variability of Prevalence and Incidence of Autism Spectrum Disorder Diagnoses in Children in Catalonia, Spain. *Autism Res*. noviembre de 2019;12(11):1693-705.
22. Fuentes J, Basurko A, Isasa I, Galende I, Mugerza MD, García-Primo P, *et al.* The ASDEU autism prevalence study in northern Spain. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. abril de 2021;30(4):579-89.
23. Morales Hidalgo P, Voltas Moreso N, Canals Sans J. Autism spectrum disorder prevalence and associated sociodemographic factors in the school population: EPINED study. *Autism*. octubre de 2021;25(7):1999-2011.
24. Lirola FV, Palomino AS. Trastornos del Espectro Autista: Tipología, prevalencia y escolarización en la provincia de Almería (España). *European Journal of Child Development, Education and Psychopathology*. 1 de julio de 2014;2(2):51-67.
25. Villegas-Lirola F. Prevalence of Autism Spectrum Disorder in Children in Andalusia (Spain). *J Autism Dev Disord*. noviembre de 2023;53(11):4438-56.
26. Francés L, Ruiz A, Soler CV, Francés J, Caules J, Hervás A, *et al.* Prevalence, comorbidities, and profiles of neurodevelopmental disorders according to the DSM-5-TR in children aged 6 years old in a European region. *Front Psychiatry*. 10 de noviembre de 2023;14:1260747.
27. Ministerio de Educación, Formación profesional y deportes. ESTADÍSTICA DE LAS ENSEÑANZAS NO UNIVERSITARIAS. ALUMNADO CON NECESIDAD ESPECÍFICA DE APOYO EDUCATIVO CURSO 2022-2023.
28. Ronald. Autism spectrum disorders and autistic traits: A decade of new twin studies. *AJM* [Internet]. 2011 [citado 22 de agosto de 2023]; Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajmg.b.31159>
29. Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, *et al.* Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 16 de enero de 2020;6(1):1-23.
30. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, *et al.* Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism. *Archives of General Psychiatry*. 1 de noviembre de 2011;68(11):1095-102.
31. Tick B, Bolton P, Happé F, Rutter M, Rijdsdijk F. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2016;57(5):585-95.
32. Bai D, Yip BHK, Windham GC, Sourander A, Francis R, Yoffe R, *et al.* Association of Genetic and Environmental Factors With Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry*. 1 de octubre de 2019;76(10):1035-43.
33. Genovese A, Butler MG. The Autism Spectrum: Behavioral, Psychiatric and Genetic Associations. *Genes*. marzo de 2023;14(3):677.
34. Ueoka I, Pham HTN, Matsumoto K, Yamaguchi M. Autism Spectrum Disorder-Related Syndromes: Modeling with *Drosophila* and Rodents. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2019;20(17):4071.
35. Masini E, Loi E, Vega-Benedetti AF, Carta M, Doneddu G, Fadda R, *et al.* An Overview of the Main Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Involved in Autism Spectrum Disorder Focusing on Synaptic Activity. *Int J Mol Sci*. 5 de noviembre de 2020;21(21):8290.
36. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, *et al.* Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet*. agosto de 2014;46(8):881-5.
37. Styles M, Alsharshani D, Samara M, Alsharshani M, Khattab A, Qoronfleh MW, *et al.* Risk factors, diagnosis, prognosis and treatment of autism. *FBL*. 1 de junio de 2020;25(9):1682-717.
38. Wang C, Geng H, Liu W, Zhang G. Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism: A meta-analysis. *Medicine*. mayo de 2017;96(18):e6696.
39. Canaguier J, Mallaret G, Paraschivescu C, Barbosa S, Le Merrer J, Becker J, *et al.* Perinatal exposure to the autism-linked metabolite p-Cresol has limited impact on early development in mice but lasting effects on adult social behavior. *Sci Rep*. 15 de abril de 2025;15(1):12934.
40. Preciado C, Baida M, Li Y, Li Y, Demopoulos C. Prenatal exposure to hypoxic risk conditions in autistic and neurotypical youth: Associated ventricular differences, sleep disturbance, and sensory processing. *Autism Research*. 2024;17(12):2547-57.
41. Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*. 1 de mayo de 2012;26(4):607-16.

42. Niehus R, Lord C. Early Medical History of Children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. abril de 2006;27(2):S120.
43. Atladóttir HÓ, Henriksen TB, Schendel DE, Parner ET. Autism After Infection, Febrile Episodes, and Antibiotic Use During Pregnancy: An Exploratory Study. *Pediatrics*. 1 de diciembre de 2012;130(6):e1447-54.
44. Slob EMA, Brew BK, Vijverberg SJH, Dijks T, van Beijsterveldt CEM, Koppelman GH, *et al*. Early-life antibiotic use and risk of attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder: results of a discordant twin study. *International Journal of Epidemiology*. 1 de abril de 2021;50(2):475-84.
45. Bölte S, Girdler S, Marschik PB. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cell Mol Life Sci*. 1 de abril de 2019;76(7):1275-97.
46. Kalra R, Gupta M, Sharma P. Recent advancement in interventions for autism spectrum disorder: A review. *Journal of Neurorestoratology*. 1 de septiembre de 2023;11(3):100068.
47. Ameis SH, Kassee C, Corbett-Dick P, Cole L, Dadhwal S, Lai MC, *et al*. Systematic review and guide to management of core and psychiatric symptoms in youth with autism. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2018;138(5):379-400.
48. Bozzatello P, Novelli R, Montemagni C, Rocca P, Bellino S. Nutraceuticals in Psychiatric Disorders: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 28 de abril de 2024;25(9):4824.
49. Quan L, Xu X, Cui Y, Han H, Hendren RL, Zhao L, *et al*. A systematic review and meta-analysis of the benefits of a gluten-free diet and/or casein-free diet for children with autism spectrum disorder. *Nutr Rev*. 8 de abril de 2022;80(5):1237-46.
50. Trivedi MS, Shah JS, Al-Mughairy S, Hodgson NW, Simms B, Trooskens GA, *et al*. Food-derived opioid peptides inhibit cysteine uptake with redox and epigenetic consequences. *J Nutr Biochem*. octubre de 2014;25(10):1011-8.
51. Mohamadkhani A. Gut Microbiota and Fecal Metabolome Perturbation in Children with Autism Spectrum Disorder. *Middle East J Dig Dis*. 21 de julio de 2018;10(4):205-12.
52. Zhang M, Chu Y, Meng Q, Ding R, Shi X, Wang Z, *et al*. A quasi-paired cohort strategy reveals the impaired detoxifying function of microbes in the gut of autistic children. *Science Advances*. 21 de octubre de 2020;6(43):eaba3760.
53. Ghalichi F, Ghaemmaghami J, Malek A, Ostadrahimi A. Effect of gluten free diet on gastrointestinal and behavioral indices for children with autism spectrum disorders: a randomized clinical trial. *World J Pediatr*. noviembre de 2016;12(4):436-42.
54. Tsai YL, Lin TL, Chang CJ, Wu TR, Lai WF, Lu CC, *et al*. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *Journal of Biomedical Science*. 4 de enero de 2019;26(1):3.
55. Martínez-González AE, Andreo-Martínez P. Prebiotics, probiotics and fecal microbiota transplantation in autism: A systematic review. *Rev Psiquiatr Salud Ment (Engl Ed)*. 2020;13(3):150-64.
56. Rahim F, Toguzbaeva K, Qasim NH, Dzhusupov KO, Zhmagaliuly A, Khozhankul R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics for patients with autism spectrum disorder: a meta-analysis and umbrella review. *Front Nutr*. 2023;10:1294089.
57. Song W, Zhang M, Teng L, Wang Y, Zhu L. Prebiotics and probiotics for autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Med Microbiol*. abril de 2022;71(4).
58. Tan Q, Orsso CE, Deehan EC, Kung JY, Tun HM, Wine E, *et al*. Probiotics, prebiotics, synbiotics, and fecal microbiota transplantation in the treatment of behavioral symptoms of autism spectrum disorder: A systematic review. *Autism Res*. septiembre de 2021;14(9):1820-36.
59. 2-WGO-Guidelines-probiotics-and-prebiotics-spanish-2023.pdf.
60. Dossaji Z, Khattak A, Tun KM, Hsu M, Batra K, Hong AS. Efficacy of Fecal Microbiota Transplant on Behavioral and Gastrointestinal Symptoms in Pediatric Autism: A Systematic Review. *Microorganisms*. 22 de marzo de 2023;11(3):806.
61. Prosperi M, Santocchi E, Guiducci L, Frinzi J, Morales MA, Tancredi R, *et al*. Interventions on Microbiota: Where Do We Stand on a Gut–Brain Link in Autism? A Systematic Review. *Nutrients*. enero de 2022;14(3):462.
62. Inoue R, Sakaue Y, Kawada Y, Tamaki R, Yasukawa Z, Ozeki M, *et al*. Dietary supplementation with partially hydrolyzed guar gum helps improve constipation and gut dysbiosis symptoms and behavioral irritability in children with autism spectrum disorder. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 7 de marzo de 2019;64.
63. Grimaldi R, Gibson GR, Vulevic J, Giallourou N, Castro-Mejía JL, Hansen LH, *et al*. A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome*. 2 de agosto de 2018;6(1):133.

64. Liu J, Liu X, Xiong XQ, Yang T, Cui T, Hou NL, *et al.* Effect of vitamin A supplementation on gut microbiota in children with autism spectrum disorders - a pilot study. *BMC Microbiology*. 22 de septiembre de 2017;17(1):204.
65. Shaaban SY, El Gendy ,Yasmin G., Mehanna ,Nayra S., El-Senousy ,Waled M., El-Feki ,Howaida S. A., Saad ,Khaled, *et al.* The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutritional Neuroscience*. 21 de octubre de 2018;21(9):676-81.
66. Liu YW, Liang MT, Chung YCE, Huang HY, Peng WS, Cheng YF, *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on Children with Autism Spectrum Disorder in Taiwan: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*. abril de 2019;11(4):820.
67. Kałużna-Czaplińska J, Błaszczak S. The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. *Nutrition*. 1 de febrero de 2012;28(2):124-6.
68. Niu M, Li Q, Zhang J, Wen F, Dang W, Duan G, *et al.* Characterization of Intestinal Microbiota and Probiotics Treatment in Children With Autism Spectrum Disorders in China. *Front Neurol* [Internet]. 5 de noviembre de 2019 [citado 22 de junio de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2019.01084/full>
69. Parracho HMRT, Gibson GR, Knott F, Bosscher D, Kleerebezem M, McCartney AL. A Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover-Designed Probiotic Feeding Study in Children Diagnosed with Autistic Spectrum Disorders. *International Journal of Probiotics & Prebiotics*. 2010;5(2):69-74.
70. Sanctuary MR, Kain JN, Chen SY, Kalanetra K, Lemay DG, Rose DR, *et al.* Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *PLOS ONE*. 9 de enero de 2019;14(1):e0210064.
71. Arnold LE, Luna RA, Williams K, Chan J, Parker RA, Wu Q, *et al.* Probiotics for Gastrointestinal Symptoms and Quality of Life in Autism: A Placebo-Controlled Pilot Trial. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 1 de noviembre de 2019;29(9):659-69.
72. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, *et al.* Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & Behavior*. 1 de enero de 2015;138:179-87.
73. Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biological Psychiatry*. 15 de noviembre de 2013;74(10):720-6.
74. Kwak M jin, Kim SH, Kim HH, Tanpure R, Kim JI, Jeon BH, *et al.* Psychobiotics and fecal microbial transplantation for autism and attention-deficit/hyperactivity disorder: microbiome modulation and therapeutic mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 24 de julio de 2023 [citado 12 de junio de 2025];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2023.1238005/full>
75. Cheng LH, Liu YW, Wu CC, Wang S, Tsai YC. Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1 de julio de 2019;27(3):632-48.
76. Sharma R, Gupta D, Mehrotra R, Mago P. Psychobiotics: The Next-Generation Probiotics for the Brain. *Curr Microbiol*. 1 de febrero de 2021;78(2):449-63.
77. Skowron K, Budzyńska A, Wiktorczyk-Kapischke N, Chomacka K, Grudlewska-Buda K, Wilk M, *et al.* The Role of Psychobiotics in Supporting the Treatment of Disturbances in the Functioning of the Nervous System-A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 15 de julio de 2022;23(14):7820.
78. Adams JB, Vargason T, Kang DW, Krajmalnik-Brown R, Hahn J. Multivariate Analysis of Plasma Metabolites in Children with Autism Spectrum Disorder and Gastrointestinal Symptoms Before and After Microbiota Transfer Therapy. *Processes*. noviembre de 2019;7(11):806.
79. Kang DW, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, *et al.* Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*. 23 de enero de 2017;5(1):10.
80. Kang DW, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-Means S, *et al.* Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep*. 9 de abril de 2019;9(1):5821.
81. Zhao Y, Wang Y, Meng F, Chen X, Chang T, Huang H, *et al.* Altered gut microbiota as potential biomarker biomarkers for autism spectrum disorder in early childhood. *Neuroscience* [Internet]. 3 de junio de 2023 [citado 5 de junio de 2023]; Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452223002026>
82. Ribera Casado JM. Centenario de Elie Metchnikoff (1845-1916). *Educación Médica*. 1 de abril de 2017;18(2):136-43.
83. Finegold SM, Summanen PH, Downes J, Corbett K, Komoriya T. Detection of *Clostridium perfringens*

- toxin genes in the gut microbiota of autistic children. *Anaerobe*. 1 de junio de 2017;45:133-7.
84. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, *et al.* Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 30 de junio de 2020;8(1):103.
85. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, *et al.* The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*. 1 de febrero de 2016;65(2):330-9.
86. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. agosto de 2014;32(8):834-41.
87. Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 de julio de 2012;18:2-4.
88. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 28 de enero de 2016;164(3):337-40.
89. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. marzo de 2010;464(7285):59-65.
90. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, *et al.* Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science*. 2 de junio de 2006;312(5778):1355-9.
91. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, *et al.* Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 29 de abril de 2016;352(6285):560-4.
92. Martínez-Guryn K, Leone V, Chang EB. Regional Diversity of the Gastrointestinal Microbiome. *Cell Host & Microbe*. 11 de septiembre de 2019;26(3):314-24.
93. She JJ, Liu WX, Ding XM, Guo G, Han J, Shi FY, *et al.* Defining the biogeographical map and potential bacterial translocation of microbiome in human 'surface organs'. *Nat Commun*. 10 de enero de 2024;15(1):427.
94. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. mayo de 2011;473(7346):174-80.
95. Costea PI, Hildebrand F, Arumugam M, Bäckhed F, Blaser MJ, Bushman FD, *et al.* Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol*. enero de 2018;3(1):8-16.
96. Borre YE, O'Keefe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends in Molecular Medicine*. 1 de septiembre de 2014;20(9):509-18.
97. O'Riordan KJ, Moloney GM, Keane L, Clarke G, Cryan JF. The gut microbiota-immune-brain axis: Therapeutic implications. *Cell Rep Med*. 6 de marzo de 2025;6(3):101982.
98. Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci*. 13 de octubre de 2018;76(3):473-93.
99. Ahmed H, Leyrolle ,Quentin, Koistinen ,Ville, Kärkkäinen ,Olli, Layé ,Sophie, Delzenne ,Nathalie, *et al.* Microbiota-derived metabolites as drivers of gut-brain communication. *Gut Microbes*. 31 de diciembre de 2022;14(1):2102878.
100. Bishai JD, Palm NW. Small Molecule Metabolites at the Host-Microbiota Interface. *J Immunol*. 1 de octubre de 2021;207(7):1725-33.
101. Bekdash RA. Neuroprotective Effects of Choline and Other Methyl Donors. *Nutrients*. diciembre de 2019;11(12):2995.
102. Iacob S, Iacob DG. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. *Front Microbiol* [Internet]. 7 de agosto de 2019 [citado 17 de junio de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.01676/full>
103. Ahern PP, Maloy KJ. Understanding immune-microbiota interactions in the intestine. *Immunology*. 2020;159(1):4-14.
104. Agustí A, García-Pardo MP, López-Almela I, Campillo I, Maes M, Romani-Pérez M, *et al.* Interplay Between the Gut-Brain Axis, Obesity and Cognitive Function. *Front Neurosci* [Internet]. 16 de marzo de 2018 [citado 17 de junio de 2025];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2018.00155/full>
105. Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol*. 15 de enero de 2017;595(2):489-503.
106. Roman P, Rueda-Ruzafa L, Cardona D, Cortes-Rodríguez A. Gut-brain axis in the executive function of autism spectrum disorder. *Behavioural Pharmacology*. octubre de 2018;29(7):654.

107. Waxenbaum JA, Reddy V, Varacallo MA. Anatomy, Autonomic Nervous System. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [citado 29 de abril de 2025]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539845/>
108. Jakob MO, Murugan S, Klose CSN. Neuro-Immune Circuits Regulate Immune Responses in Tissues and Organ Homeostasis. *Front Immunol*. 20 de marzo de 2020;11:308.
109. Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front Neurosci* [Internet]. 7 de febrero de 2018 [citado 30 de abril de 2025];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2018.00049/full>
110. Dicks LMT. Gut Bacteria and Neurotransmitters. *Microorganisms*. septiembre de 2022;10(9):1838.
111. Horder J, Petrinovic MM, Mendez MA, Bruns A, Takumi T, Spooren W, *et al*. Glutamate and GABA in autism spectrum disorder—a translational magnetic resonance spectroscopy study in man and rodent models. *Transl Psychiatry*. 25 de mayo de 2018;8(1):106.
112. Hyland NP, Cryan JF. Microbe-host interactions: Influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Developmental Biology*. 15 de septiembre de 2016;417(2):182-7.
113. Waisman A, Liblau RS, Becher B. Innate and adaptive immune responses in the CNS. *The Lancet Neurology*. 1 de septiembre de 2015;14(9):945-55.
114. Neurath MF, Artis D, Becker C. The intestinal barrier: a pivotal role in health, inflammation, and cancer. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 1 de junio de 2025;10(6):573-92.
115. Ma Q, Xing C, Long W, Wang HY, Liu Q, Wang RF. Impact of microbiota on central nervous system and neurological diseases: the gut-brain axis. *Journal of Neuroinflammation*. 1 de marzo de 2019;16(1):53.
116. Rickenbach C, Gericke C. Specificity of Adaptive Immune Responses in Central Nervous System Health, Aging and Diseases. *Front Neurosci* [Internet]. 20 de enero de 2022 [citado 30 de abril de 2025];15. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2021.806260/full>
117. Toriello M, González-Quintanilla V, Pascual J. El sistema glinfático y su implicación en las enfermedades del sistema nervioso. *Medicina Clínica*. 9 de abril de 2021;156(7):339-43.
118. Erny D, de Angelis ALH, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, *et al*. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci*. julio de 2015;18(7):965-77.
119. Davoli-Ferreira M, Thomson CA, McCoy KD. Microbiota and Microglia Interactions in ASD. *Front Immunol* [Internet]. 25 de mayo de 2021 [citado 30 de abril de 2025];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.676255/full>
120. Hughes HK, R.J. Moreno, Ashwood P. Innate immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder (ASD). *Brain, Behavior, and Immunity*. 1 de febrero de 2023;108:245-54.
121. Loh JS, Mak WQ, Tan LKS, Ng CX, Chan HH, Yeow SH, *et al*. Microbiota-gut-brain axis and its therapeutic applications in neurodegenerative diseases. *Sig Transduct Target Ther*. 16 de febrero de 2024;9(1):1-53.
122. Clarkson BD, Héninger E, Harris MG, Lee J, Sandor M, Fabry Z. Innate-Adaptive Crosstalk: How Dendritic Cells Shape Immune Responses in the CNS. En: Lambris JD, Hajishengallis G, editores. *Current Topics in Innate Immunity II* [Internet]. New York, NY: Springer; 2012 [citado 26 de junio de 2025]. p. 309-33. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_18)
123. Rusch JA, Layden BT, Dugas LR. Signalling cognition: the gut microbiota and hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Front Endocrinol* [Internet]. 19 de junio de 2023 [citado 26 de junio de 2025];14. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2023.1130689/full>
124. de Weerth C. Do bacteria shape our development? Crosstalk between intestinal microbiota and HPA axis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1 de diciembre de 2017;83:458-71.
125. Sheng JA, Bales NJ, Myers SA, Bautista AI, Roueifar M, Hale TM, *et al*. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 13 de enero de 2021 [citado 26 de junio de 2025];14. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/behavioral-neuroscience/articles/10.3389/fnbeh.2020.601939/full>

126. Maniam J, Antoniadis C, Morris MJ. Early-Life Stress, HPA Axis Adaptation, and Mechanisms Contributing to Later Health Outcomes. *Front Endocrinol* [Internet]. 13 de mayo de 2014 [citado 26 de junio de 2025];5. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2014.00073/full>
127. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol* [Internet]. 17 de febrero de 2016 [citado 17 de junio de 2025];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00185/full>
128. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. junio de 2016;16(6):341-52.
129. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*. 8 de junio de 2012;336(6086):1262-7.
130. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, *et al.* The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab*. 4 de mayo de 2011;13(5):517-26.
131. Obrenovich MEM. Leaky Gut, Leaky Brain? *Microorganisms*. 18 de octubre de 2018;6(4):107.
132. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. agosto de 2019;16(8):461-78.
133. Fernandes MF, de Oliveira S, Portovedo M, Rodrigues PB, Vinolo MAR. Effect of Short Chain Fatty Acids on Age-Related Disorders. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1260:85-105.
134. Nankova BB, Agarwal R, MacFabe DF, Gamma EFL. Enteric Bacterial Metabolites Propionic and Butyric Acid Modulate Gene Expression, Including CREB-Dependent Catecholaminergic Neurotransmission, in PC12 Cells - Possible Relevance to Autism Spectrum Disorders. *PLOS ONE*. 29 de agosto de 2014;9(8):e103740.
135. Stilling RM, van de Wouw M, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? *Neurochemistry International*. 1 de octubre de 2016;99:110-32.
136. Bachem A, Makhlof C, Binger KJ, Souza DP de, Tull D, Hochheiser K, *et al.* Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8+ T Cells. *Immunity*. 20 de agosto de 2019;51(2):285-297.e5.
137. Tran SMS, Mohajeri MH. The Role of Gut Bacterial Metabolites in Brain Development, Aging and Disease. *Nutrients*. marzo de 2021;13(3):732.
138. Hentges DJ, Maier BR, Burton GC, Flynn MA, Tsutakawa RK. Effect of a high-beef diet on the fecal bacterial flora of humans. *Cancer Res*. febrero de 1977;37(2):568-71.
139. Świątecka D, Narbad A, Ridgway KP, Kostyra H. The study on the impact of glycated pea proteins on human intestinal bacteria. *Int J Food Microbiol*. 31 de enero de 2011;145(1):267-72.
140. Meddah AT, Yazourh A, Desmet I, Risbourg B, Verstraete W, Romond MB. The regulatory effects of whey retentate from bifidobacteria fermented milk on the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *J Appl Microbiol*. diciembre de 2001;91(6):1110-7.
141. Portune KJ, Beaumont M, Davila AM, Tomé D, Blachier F, Sanz Y. Gut microbiota role in dietary protein metabolism and health-related outcomes: The two sides of the coin. *Trends in Food Science & Technology*. 1 de noviembre de 2016;57:213-32.
142. Kaur H, Bose C, Mande SS. Tryptophan Metabolism by Gut Microbiome and Gut-Brain-Axis: An in silico Analysis. *Front Neurosci* [Internet]. 18 de diciembre de 2019 [citado 25 de abril de 2025];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2019.01365/full>
143. Parker A, Fonseca ,Sonia, and Carding SR. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes*. 3 de marzo de 2020;11(2):135-57.
144. Ho L, Zhao D, Ono K, Ruan K, Mogno I, Tsuji M, *et al.* Heterogeneity in gut microbiota drive polyphenol metabolism that influences  $\alpha$ -synuclein misfolding and toxicity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1 de febrero de 2019;64:170-81.
145. Shaw W. Increased urinary excretion of a 3-(3-hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic acid (HPPHA), an abnormal phenylalanine metabolite of *Clostridia* spp. in the gastrointestinal tract, in urine samples from patients with autism and schizophrenia. *Nutritional Neuroscience*. junio de 2010;13(3):135-43.
146. Xiong X, Liu D, Wang Y, Zeng T, Peng Y. Urinary 3-(3-Hydroxyphenyl)-3-hydroxypropionic Acid, 3-Hydroxyphenylacetic Acid, and 3-Hydroxyhippuric Acid Are Elevated in Children with Autism Spectrum

- Disorders. *BioMed Research International*. 30 de marzo de 2016;2016:e9485412.
147. Daneberga Z, Nakazawa-Miklasevica M, Berga-Svitina E, Murmane D, Isarova D, Cupane L, *et al*. Urinary organic acids spectra in children with altered gut microbiota composition and autistic spectrum disorder. *Nordic Journal of Psychiatry*. 3 de octubre de 2022;76(7):523-9.
  148. Noto A, Fanos ,Vassilios, Barberini ,Luigi, Grapov ,Dmitry, Fattuoni ,Claudia, Zaffanello ,Marco, *et al*. The urinary metabolomics profile of an Italian autistic children population and their unaffected siblings. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 1 de octubre de 2014;27(sup2):46-52.
  149. Wang D, Ho L, Faith J, Ono K, Janle EM, Lachcik PJ, *et al*. Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol-derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid oligomerization. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2015;59(6):1025-40.
  150. van Kessel SP, El Aidy S. Bacterial Metabolites Mirror Altered Gut Microbiota Composition in Patients with Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*. 8 de octubre de 2019;9(s2):S359-70.
  151. Pierce CG, Srinivasan A, Ramasubramanian AK, López-Ribot JL. From Biology to Drug Development: New Approaches to Combat the Threat of Fungal Biofilms. *Microbiol Spectr*. junio de 2015;3(3).
  152. Chen SG, Stribinskis V, Rane MJ, Demuth DR, Gozal E, Roberts AM, *et al*. Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep*. 6 de octubre de 2016;6(1):34477.
  153. Friedland RP, Chapman MR. The role of microbial amyloid in neurodegeneration. *PLOS Pathogens*. 21 de diciembre de 2017;13(12):e1006654.
  154. Van Gerven N, Klein RD, Hultgren SJ, Remaut H. Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogenesis. *Trends Microbiol*. noviembre de 2015;23(11):693-706.
  155. Prusiner SB. Biology and Genetics of Prions Causing Neurodegeneration. *Annual Review of Genetics*. 23 de noviembre de 2013;47(Volume 47, 2013):601-23.
  156. Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 1 de marzo de 2003;24(2):197-211.
  157. ICSC 0031 - p-CRESOL [Internet]. [citado 10 de mayo de 2025]. Disponible en: [https://chemicalsafety.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_card\\_id=0031&p\\_version=1&p\\_lang=es](https://chemicalsafety.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=0031&p_version=1&p_lang=es)
  158. OECD. m-/p-Cresol category, screening information data set, initial assessment report [Internet]. París: UNEP Publications; 2003. Disponible en: [www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecdsids/m-p-cresols.pdf](http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecdsids/m-p-cresols.pdf)
  159. Persico AM, Napolioni V. Urinary p-cresol in autism spectrum disorder. *Neurotoxicology and Teratology*. 1 de marzo de 2013;36:82-90.
  160. Zheng Y, Bek MK, Prince NZ, Peralta Marzal LN, Garsen J, Perez Pardo P, *et al*. The Role of Bacterial-Derived Aromatic Amino Acids Metabolites Relevant in Autism Spectrum Disorders: A Comprehensive Review. *Front Neurosci*. 2021;15:738220.
  161. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, *et al*. Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell*. 19 de diciembre de 2013;155(7):1451-63.
  162. Day F, O'Sullivan J, Pook C. 4-Ethylphenol—fluxes, metabolism and excretion of a gut microbiome derived neuromodulator implicated in autism. *Front Mol Biosci* [Internet]. 12 de octubre de 2023 [citado 26 de junio de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-biosciences/articles/10.3389/fmolb.2023.1267754/full>
  163. Gabriele S, Sacco R, Cerullo S, Neri C, Urbani A, Tripi G, *et al*. Urinary p -cresol is elevated in young French children with autism spectrum disorder: a replication study. *Biomarkers*. septiembre de 2014;19(6):463-70.
  164. Finegold SM, Molitoris D, Song Y, Liu C, Vaisanen ML, Bolte E, *et al*. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis*. 1 de septiembre de 2002;35(Suppl 1):S6-16.
  165. Harrison MA, Faulds-Pain A, Kaur H, Dupuy B, Henriques AO, Martin-Verstraete I, *et al*. *Clostridioides difficile* para-Cresol Production Is Induced by the Precursor para-Hydroxyphenylacetate. *Journal of Bacteriology*. 25 de agosto de 2020;202(18):10.1128/jb.00282-20.
  166. Passmore IJ, Letertre MPM, Preston MD, Bianconi I, Harrison MA, Nasher F, *et al*. Para-cresol production by *Clostridium difficile* affects microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria. *PLOS Pathogens*. 12 de septiembre de 2018;14(9):e1007191.

167. Song Y, Liu C, Finegold SM. Real-Time PCR Quantitation of Clostridia in Feces of Autistic Children. *Appl Environ Microbiol.* noviembre de 2004;70(11):6459-65.
168. Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, McCartney AL. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology.* 2005;54(10):987-91.
169. Saito Y, Sato T, Nomoto K, Tsuji H. Identification of phenol- and p-cresol-producing intestinal bacteria by using media supplemented with tyrosine and its metabolites. *FEMS Microbiology Ecology.* 1 de septiembre de 2018;94(9):fyy125.
170. De Angelis M, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Giacomo A, Serrazanetti DI, *et al.* Fecal Microbiota and Metabolome of Children with Autism and Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified. Heimesaat MM, editor. *PLoS ONE.* 9 de octubre de 2013;8(10):e76993.
171. Yang C, Xiao H, Zhu H, Du Y, Wang L. Revealing the gut microbiome mystery: A meta-analysis revealing differences between individuals with autism spectrum disorder and neurotypical children. *Biosci Trends.* 9 de julio de 2024;18(3):233-49.
172. Russell WR, Duncan SH, Scobbie L, Duncan G, Cantlay L, Calder AG, *et al.* Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2013;57(3):523-35.
173. Dou L, Cerini C, Brunet P, Guilianelli C, Moal V, Grau G, *et al.* P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. *Kidney International.* 1 de diciembre de 2002;62(6):1999-2009.
174. Cerini C, Dou L, Anfosso F, Sabatier F, Moal V, Glorieux G, *et al.* P-cresol, a uremic retention solute, alters the endothelial barrier function in vitro. *Thrombosis and Haemostasis.* 29 de noviembre de 2017;92:140-50.
175. Guzmán-Salas S, Weber A, Malci A, Lin X, Herrera-Molina R, Cerpa W, *et al.* The metabolite p-cresol impairs dendritic development, synaptogenesis, and synapse function in hippocampal neurons: Implications for autism spectrum disorder. *Journal of Neurochemistry.* 2022;161(4):335-49.
176. Sun CY, Cheng ML, Pan HC, Lee JH, Lee CC. Protein-bound uremic toxins impaired mitochondrial dynamics and functions. *Oncotarget.* 8 de septiembre de 2017;8(44):77722-33.
177. Flynn CK, Adams JB, Krajmalnik-Brown R, Khoruts A, Sadowsky MJ, Nirmalkar K, *et al.* Review of Elevated Para-Cresol in Autism and Possible Impact on Symptoms. *International Journal of Molecular Sciences.* enero de 2025;26(4):1513.
178. Andriamihaja M, Lan A, Beaumont M, Audebert M, Wong X, Yamada K, *et al.* The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 1 de agosto de 2015;85:219-27.
179. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, *et al.* p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* abril de 2013;83(4):582-92.
180. Edamatsu T, Fujieda A, Itoh Y. Phenyl sulfate, indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate decrease glutathione level to render cells vulnerable to oxidative stress in renal tubular cells. *PLOS ONE.* 23 de febrero de 2018;13(2):e0193342.
181. Miot S, Akbaraly T, Michelon C, Couderc S, Crepiat S, Loubersac J, *et al.* Comorbidity Burden in Adults With Autism Spectrum Disorders and Intellectual Disabilities—A Report From the EFAAR (Frailty Assessment in Ageing Adults With Autism Spectrum and Intellectual Disabilities) Study. *Front Psychiatry [Internet].* 19 de septiembre de 2019 [citado 15 de mayo de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/psychiatry/articles/10.3389/fpsy.2019.00617/full>
182. Liu WC, Tomino Y, Lu KC. Impacts of Indoxyl Sulfate and p-Cresol Sulfate on Chronic Kidney Disease and Mitigating Effects of AST-120. *Toxins.* septiembre de 2018;10(9):367.
183. Sato E, Saigusa D, Mishima E, Uchida T, Miura D, Morikawa-Ichinose T, *et al.* Impact of the Oral Adsorbent AST-120 on Organ-Specific Accumulation of Uremic Toxins: LC-MS/MS and MS Imaging Techniques. *Toxins.* enero de 2018;10(1):19.
184. Needham BD, Adame MD, Serena G, Rose DR, Preston GM, Conrad MC, *et al.* Plasma and Fecal Metabolite Profiles in Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry.* 1 de marzo de 2021;89(5):451-62.
185. Yan Z, Zhong HM, Maher N, Torres R, Leo GC, Caldwell GW, *et al.* Bioactivation of 4-methylphenol (p-cresol) via cytochrome P450-mediated aromatic oxidation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* diciembre de 2005;33(12):1867-76.
186. Martínez-González AE, Andreo-Martínez P. The Role of Gut Microbiota in Gastrointestinal

- Symptoms of Children with ASD. *Medicina (Kaunas)*. 26 de julio de 2019;55(8):408.
187. Gabriele S, Sacco R, Altieri L, Neri C, Urbani A, Bravaccio C, *et al.* Slow intestinal transit contributes to elevated urinary *p*-cresol level in Italian autistic children: Urinary *p*-Cresol in Autism Spectrum Disorder. *Autism Research*. julio de 2016;9(7):752-9.
188. Yitik Tonkaz G, Esin IS, Turan B, Uslu H, Dursun OB. Determinants of Leaky Gut and Gut Microbiota Differences in Children With Autism Spectrum Disorder and Their Siblings. *J Autism Dev Disord*. 1 de julio de 2023;53(7):2703-16.
189. Piras C, Mussap M, Noto A, De Giacomo A, Cristofori F, Spada M, *et al.* Alterations of the Intestinal Permeability are Reflected by Changes in the Urine Metabolome of Young Autistic Children: Preliminary Results. *Metabolites*. febrero de 2022;12(2):104.
190. Al-Ayadhi L, Zayed N, Bhat RS, Moubayed NMS, Al-Muammar MN, El-Ansary A. The use of biomarkers associated with leaky gut as a diagnostic tool for early intervention in autism spectrum disorder: a systematic review. *Gut Pathog*. 13 de septiembre de 2021;13(1):54.
191. Bermudez-Martin P, Becker JAJ, Caramello N, Fernandez SP, Costa-Campos R, Canaguier J, *et al.* The microbial metabolite *p*-Cresol induces autistic-like behaviors in mice by remodeling the gut microbiota. *Microbiome*. 8 de julio de 2021;9(1):157.
192. Tevzadze G, Barbakadze T, Kvergelidze E, Zhuravliova E, Shanshiashvili L, Mikeladze D, *et al.* Gut neurotoxin *p*-cresol induces brain-derived neurotrophic factor secretion and increases the expression of neurofilament subunits in PC-12 cells. *AIMSN*. 2022;9(1):12-23.
193. Gigi T, Elene Z, Tamar B, Lali S, Davit D, Zaqaria N, *et al.* Gut neurotoxin *p*-cresol induces differential expression of GLUN2B and GLUN2A subunits of the NMDA receptor in the hippocampus and nucleus accumbens in healthy and audiogenic seizure-prone rats. *AIMSN*. 2020;7(1):30-42.
194. Osredkar J, Baškovič BŽ, FINDERLE P, Bobrowska-Korczak B, Gątarek P, Rosiak A, *et al.* Relationship between Excreted Uremic Toxins and Degree of Disorder of Children with ASD. *IJMS*. 11 de abril de 2023;24(8):7078.
195. Sankowski B, Książarczyk K, Raćkowska E, Szlufik S, Kozirowski D, Giebułtowski J. Higher cerebrospinal fluid to plasma ratio of *p*-cresol sulfate and indoxyl sulfate in patients with Parkinson's disease. *Clinica Chimica Acta*. 1 de febrero de 2020;501:165-73.
196. Saha S, Chatterjee M, Dutta N, Sinha S, Mukhopadhyay K. Analysis of neurotransmitters validates the importance of the dopaminergic system in autism spectrum disorder. *World J Pediatr*. 1 de agosto de 2023;19(8):770-81.
197. Martineau J, Barthélémy C, Jouve J, Muh JP, LeLord G. Monoamines (serotonin and Catecholamines) and Their Derivatives in Infantile Autism: Age-Related Changes and Drug Effects. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 1992;34(7):593-603.
198. Faure V, Cerini C, Paul P, Berland Y, Dignat-George F, Brunet P. The uremic solute *p*-cresol decreases leukocyte transendothelial migration in vitro. *International Immunology*. 1 de octubre de 2006;18(10):1453-9.
199. Kawakami K, Makino I, Kuyou K, Ikuo U, Uchida K, Kazumi, and Onoue M. *p*-Cresol inhibits IL-12 production by murine macrophages stimulated with bacterial immunostimulant. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 1 de junio de 2009;31(2):304-9.
200. Zheng Y, Prince NZ, Peralta Marzal LN, Ahmed S, Garssen J, Perez Pardo P, *et al.* The Autism Spectrum Disorder-Associated Bacterial Metabolite *p*-Cresol Derails the Neuroimmune Response of Microglial Cells Partially via Reduction of ADAM17 and ADAM10. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2022;23(19):11013.
201. Mai AS, Yau CE, Tseng FS, Foo QXJ, Wang DQ, Tan EK. Linking autism spectrum disorders and parkinsonism: clinical and genetic association. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2023;10(4):484-96.
202. Yao L, Liang W, Chen J, Wang Q, Huang X. Constipation in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *European Neurology*. 31 de enero de 2023;86(1):34-44.
203. Tevzadze G, Shanshiashvili L, Mikeladze D. Children with epilepsy and autistic spectrum disorders show similarly high levels of urinary *p*-cresol. *JBPC*. 30 de junio de 2017;17(2):77-80.
204. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science*. 18 de diciembre de 2009;326(5960):1694-7.
205. Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*. noviembre de 2005;6(11):877-88.
206. Cowan CSM, Dinan TG, Cryan JF. Annual Research Review: Critical windows – the microbiota–gut–brain axis in neurocognitive development.

- Journal of Child Psychology and Psychiatry. 2020;61(3):353-71.
207. López I, Förster J. Trastornos del neurodesarrollo: dónde estamos hoy y hacia dónde nos dirigimos. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 1 de julio de 2022;33(4):367-78.
208. Förster J, López I. Neurodesarrollo humano: un proceso de cambio continuo de un sistema abierto y sensible al contexto. *Rev Med Clin Condes*. 1 de julio de 2022;33(4):338-46.
209. Lenroot RK, Giedd JN. Brain development in children and adolescents: insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci Biobehav Rev*. 2006;30(6):718-29.
210. Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, *et al*. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med*. 19 de noviembre de 2014;6(263):263ra158.
211. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, *et al*. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. abril de 2008;159(3):187-93.
212. Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep*. 22 de marzo de 2016;6:23129.
213. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 21 de mayo de 2014;6(237):237ra65.
214. Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the «sterile womb» and «in utero colonization» hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 28 de abril de 2017;5(1):48.
215. Lauder AP, Roche AM, Sherrill-Mix S, Bailey A, Laughlin AL, Bittinger K, *et al*. Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome*. 23 de junio de 2016;4:29.
216. Lim ES, Rodriguez C, Holtz LR. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome*. 11 de mayo de 2018;6(1):87.
217. Panzer JJ, Romero R, Greenberg JM, Winters AD, Galaz J, Gomez-Lopez N, *et al*. Is there a placental microbiota? A critical review and re-analysis of published placental microbiota datasets. *BMC Microbiol*. 18 de marzo de 2023;23(1):76.
218. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, *et al*. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. octubre de 2018;562(7728):583-8.
219. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, *et al*. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de junio de 2010;107(26):11971-5.
220. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, *et al*. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. agosto de 2006;118(2):511-21.
221. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, *et al*. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*. abril de 2014;63(4):559-66.
222. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, *et al*. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ*. 19 de marzo de 2013;185(5):385-94.
223. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämäläinen AM, Härkönen T, Ryhänen SJ, *et al*. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatments on strain-level diversity and stability. *Sci Transl Med*. 15 de junio de 2016;8(343):343ra81.
224. Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. Maturation of the Infant Microbiome Community Structure and Function Across Multiple Body Sites and in Relation to Mode of Delivery. *Nat Med*. marzo de 2017;23(3):314-26.
225. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, *et al*. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. junio de 2012;486(7402):222-7.
226. Blakemore SJ. Imaging brain development: the adolescent brain. *Neuroimage*. junio de 2012;61(2):397-406.
227. Zhou M, Fan Y, Xu L, Yu Z, Wang S, Xu H, *et al*. Microbiome and tryptophan metabolomics analysis in adolescent depression: roles of the gut microbiota in the regulation of tryptophan-derived neurotransmitters and behaviors in human and mice. *Microbiome*. 30 de junio de 2023;11(1):145.
228. Agans R, Rigsbee L, Kenche H, Michail S, Khamis HJ, Paliy O. Distal gut microbiota of

- adolescent children is different from that of adults. *FEMS Microbiol Ecol.* agosto de 2011;77(2):404-12.
229. Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O'Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, *et al.* Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behav Immun.* agosto de 2015;48:165-73.
230. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 19 de enero de 2023;186(2):243-78.
231. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* agosto de 2012;488(7410):178-84.
232. Hébuterne X. Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* enero de 2003;6(1):49-54.
233. Alamoudi MU, Hosie S, Shindler AE, Wood JL, Franks AE, Hill-Yardin EL. Comparing the Gut Microbiome in Autism and Preclinical Models: A Systematic Review. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:905841.
234. Lim JS, Lim MY, Choi Y, Ko G. Modeling environmental risk factors of autism in mice induces IBD-related gut microbial dysbiosis and hyperserotonemia. *Molecular Brain.* 20 de abril de 2017;10(1):14.
235. de Theije CGM, Wopereis H, Ramadan M, van Eijndthoven T, Lambert J, Knol J, *et al.* Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* marzo de 2014;37:197-206.
236. Xie R, Sun Y, Wu J, Huang S, Jin G, Guo Z, *et al.* Maternal High Fat Diet Alters Gut Microbiota of Offspring and Exacerbates DSS-Induced Colitis in Adulthood. *Front Immunol.* 13 de noviembre de 2018;9:2608.
237. Stilling RM, Ryan FJ, Hoban AE, Shanahan F, Clarke G, Claesson MJ, *et al.* Microbes & neurodevelopment--Absence of microbiota during early life increases activity-related transcriptional pathways in the amygdala. *Brain Behav Immun.* noviembre de 2015;50:209-20.
238. Stilling RM, Moloney GM, Ryan FJ, Hoban AE, Bastiaanssen TF, Shanahan F, *et al.* Social interaction-induced activation of RNA splicing in the amygdala of microbiome-deficient mice. *Elife.* 29 de mayo de 2018;7:e33070.
239. Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, Gandal MJ, Wang B, Kim YM, *et al.* Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell.* 30 de mayo de 2019;177(6):1600-1618.e17.
240. Newell C, Shutt TE, Ahn Y, Hittel DS, Khan A, Rho JM, *et al.* Tissue Specific Impacts of a Ketogenic Diet on Mitochondrial Dynamics in the BTBRT+tf/j Mouse. *Front Physiol* [Internet]. 27 de diciembre de 2016 [citado 26 de junio de 2025];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2016.00654/full>
241. Coretti L, Paparo L, Riccio MP, Amato F, Cuomo M, Natale A, *et al.* Gut Microbiota Features in Young Children With Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2018 [citado 26 de agosto de 2023];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03146>
242. Tabouy L, Getselter D, Ziv O, Karpuj M, Tabouy T, Lukic I, *et al.* Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* octubre de 2018;73:310-9.
243. Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, *et al.* Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet.* mayo de 2003;34(1):27-9.
244. Altimiras F, Garcia JA, Palacios-García I, Hurley MJ, Deacon R, González B, *et al.* Altered Gut Microbiota in a Fragile X Syndrome Mouse Model. *Front Neurosci* [Internet]. 26 de mayo de 2021 [citado 26 de junio de 2025];15. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2021.653120/full>
245. Septyaningtrias DE, Lin CW, Ouchida R, Nakai N, Suda W, Hattori M, *et al.* Altered microbiota composition reflects enhanced communication in 15q11-13 CNV mice. *Neuroscience Research.* 1 de diciembre de 2020;161:59-67.
246. Li Y, Luo ZY, Hu YY, Bi YW, Yang JM, Zou WJ, *et al.* The gut microbiota regulates autism-like behavior by mediating vitamin B6 homeostasis in EphB6-deficient mice. *Microbiome.* 20 de agosto de 2020;8(1):120.
247. Andreo-Martínez P, Rubio-Aparicio M, Sánchez-Meca J, Veas A, Martínez-González AE. A Meta-analysis of Gut Microbiota in Children with Autism. *J Autism Dev Disord.* 1 de marzo de 2022;52(3):1374-87.
248. Xu M, Xu X, Li J, Li F. Association Between Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Psychiatry* [Internet]. 2019 [citado 6 de septiembre de 2023];10. Disponible en:

- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2019.00473>
249. Iglesias-Vázquez L, Van Ginkel Riba G, Arija V, Canals J. Composition of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. marzo de 2020;12(3):792.
250. Lin P, Zhang Q, Sun J, Li Q, Li D, Zhu M, *et al*. A comparison between children and adolescents with autism spectrum disorders and healthy controls in biomedical factors, trace elements, and microbiota biomarkers: a meta-analysis. *Front Psychiatry*. 2023;14:1318637.
251. Hua X, Zhu J, Yang T, Guo M, Li Q, Chen J, *et al*. The Gut Microbiota and Associated Metabolites Are Altered in Sleep Disorder of Children With Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Psychiatry* [Internet]. 2020 [citado 29 de agosto de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2020.00855>
252. Srikantha P, Mohajeri MH. The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*. 29 de abril de 2019;20(9):2115.
253. Goines PE, Ashwood P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment. *Neurotoxicology and Teratology*. 1 de marzo de 2013;36:67-81.
254. Argou-Cardozo I, Zeidán-Chuliá F. Clostridium Bacteria and Autism Spectrum Conditions: A Systematic Review and Hypothetical Contribution of Environmental Glyphosate Levels. *Med Sci (Basel)*. 4 de abril de 2018;6(2):29.
255. Nogay NH, and Nahikian-Nelms M. Can we reduce autism-related gastrointestinal and behavior problems by gut microbiota based dietary modulation? A review. *Nutritional Neuroscience*. 4 de mayo de 2021;24(5):327-38.
256. Wu F, Guo X, Zhang J, Zhang M, Ou Z, Peng Y. *Phascolarctobacterium faecium* abundant colonization in human gastrointestinal tract. *Exp Ther Med*. octubre de 2017;14(4):3122-6.
257. Zhang M, Ma W, Zhang J, He Y, Wang J. Analysis of gut microbiota profiles and microbe-disease associations in children with autism spectrum disorders in China. *Sci Rep*. 18 de septiembre de 2018;8(1):13981.
258. Andreo-Martínez P, García-Martínez N, Sánchez-Samper EP, Martínez-González AE. An approach to gut microbiota profile in children with autism spectrum disorder. *Environ Microbiol Rep*. abril de 2020;12(2):115-35.
259. Shen J. Modeling the glutamate-glutamine neurotransmitter cycle. *Front Neuroenergetics*. 2013;5:1.
260. Moya-Pérez A, Perez-Villalba A, Benítez-Páez A, Campillo I, Sanz Y. Bifidobacterium CECT 7765 modulates early stress-induced immune, neuroendocrine and behavioral alterations in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 1 de octubre de 2017;65:43-56.
261. Vallée A, Vallée JN. Warburg effect hypothesis in autism Spectrum disorders. *Molecular Brain*. 4 de enero de 2018;11(1):1.
262. Li Z, Liu S, Liu F, Dai N, Liang R, Lv S, *et al*. Gut microbiota and autism spectrum disorders: a bidirectional Mendelian randomization study. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 14 de diciembre de 2023 [citado 18 de junio de 2025];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2023.1267721/full>
263. Wang J, Cao Y, Hou W, Bi D, Yin F, Gao Y, *et al*. Fecal microbiota transplantation improves VPA-induced ASD mice by modulating the serotonergic and glutamatergic synapse signaling pathways. *Transl Psychiatry*. 21 de enero de 2023;13(1):1-13.
264. Casas-Tinto S, Zhang Y, Sanchez-Garcia J, Gomez-Velazquez M, Rincon-Limas DE, Fernandez-Funez P. The ER stress factor XBP1s prevents amyloid- $\beta$  neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*. 1 de junio de 2011;20(11):2144-60.
265. Salim S, Banu A, Alwa A, Gowda SBM, Mohammad F. The gut-microbiota-brain axis in autism: what Drosophila models can offer? *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 15 de septiembre de 2021;13(1):37.
266. Bellosta P, Soldano A. Dissecting the Genetics of Autism Spectrum Disorders: A Drosophila Perspective. *Frontiers in Physiology* [Internet]. 2019 [citado 18 de agosto de 2023];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00987>
267. Repicky S, Broadie K. Metabotropic Glutamate Receptor-Mediated Use-Dependent Down-Regulation of Synaptic Excitability Involves the Fragile X Mental Retardation Protein. *Journal of Neurophysiology*. febrero de 2009;101(2):672-87.
268. Bykhovskaia M, Vasin A. Electrophysiological analysis of synaptic transmission in Drosophila.

- Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. septiembre de 2017;6(5).
269. Eltokhi A, Santuy A, Merchan-Perez A, Sprengel R. Glutamatergic Dysfunction and Synaptic Ultrastructural Alterations in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorder: Evidence from Human and Rodent Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 23 de diciembre de 2020;22:59.
270. Luczynski P, McVey Neufeld KA, Oriach CS, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol*. 23 de febrero de 2016;19(8):pyw020.
271. Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, *et al*. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*. 3 de septiembre de 2014;83(5):1131-43.
272. E. Conti, J. Mitra, S. Calderoni, K. Pannek, K. K. Shen, A. Pagnozzi, S. Rose, S. Mazzotti, D. Scelfo, M. Tosetti, F. Muratori, G. Cioni, A. Guzzetta. Network over-connectivity differentiates autism spectrum disorder from other developmental disorders in toddlers: A diffusion MRI study. 2017 [citado 20 de mayo de 2025]; Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hbm.23520>
273. Supekar K, Uddin LQ, Khouzam A, Phillips J, Gaillard WD, Kenworthy LE, *et al*. Brain hyperconnectivity in children with autism and its links to social deficits. *Cell Rep*. 14 de noviembre de 2013;5(3):738-47.
274. Heijtz RD, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, *et al*. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 de febrero de 2011;108(7):3047-52.
275. Kelly JR, Minuto C, Cryan JF, Clarke G, Dinan TG. Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurosci* [Internet]. 15 de septiembre de 2017 [citado 20 de mayo de 2025];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2017.00490/full>
276. Piochon C, Kloth AD, Grasselli G, Titley HK, Nakayama H, Hashimoto K, *et al*. Cerebellar plasticity and motor learning deficits in a copy-number variation mouse model of autism. *Nat Commun*. 24 de noviembre de 2014;5:5586.
277. Auerbach BD, Osterweil EK, Bear MF. Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*. diciembre de 2011;480(7375):63-8.
278. Hansel C. Deregulation of synaptic plasticity in autism. *Neurosci Lett*. 1 de enero de 2019;688:58-61.
279. Douglas AE. The Drosophila model for microbiome research. *Lab Anim*. junio de 2018;47(6):157-64.
280. Broderick NA, and Lemaitre B. Gut-associated microbes of *Drosophila melanogaster*. *Gut Microbes*. 14 de julio de 2012;3(4):307-21.
281. Walter J, Armet AM, Finlay BB, Shanahan F. Establishing or Exaggerating Causality for the Gut Microbiome: Lessons from Human Microbiota-Associated Rodents. *Cell*. 23 de enero de 2020;180(2):221-32.
282. Du Y, Chen L, Yan MC, Wang YL, Zhong XL, Xu CX, *et al*. Neurometabolite levels in the brains of patients with autism spectrum disorders: A meta-analysis of proton magnetic resonance spectroscopy studies (N = 1501). *Mol Psychiatry*. 28 de abril de 2023;1-12.
283. Roman-Urrestarazu A, van Kessel R, Allison C, Matthews FE, Brayne C, Baron-Cohen S. Association of Race/Ethnicity and Social Disadvantage With Autism Prevalence in 7 Million School Children in England. *JAMA Pediatr*. 1 de junio de 2021;175(6):e210054.
284. Salari N, Rasoulpoor S, Rasoulpoor S, Shohaimi S, Jafarpour S, Abdoli N, *et al*. The global prevalence of autism spectrum disorder: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Ital J Pediatr*. 8 de julio de 2022;48(1):112.
285. Buie T, Margolis K. Considerations for treating autistic individuals in gastroenterology clinics. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. agosto de 2024;9(8):684-6.
286. Penzol MJ, Salazar de Pablo G, Llorente C, Moreno C, Hernández P, Dorado ML, *et al*. Functional Gastrointestinal Disease in Autism Spectrum Disorder: A Retrospective Descriptive Study in a Clinical Sample. *Frontiers in Psychiatry* [Internet]. 2019 [citado 19 de septiembre de 2023];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2019.00179>
287. Madra M, Ringel R, Margolis KG. Gastrointestinal Issues and Autism Spectrum Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. julio de 2020;29(3):501-13.
288. Leader G, Abberton C, Cunningham S, Gilmartin K, Grudzien M, Higgins E, *et al*. Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum

- Disorder: A Systematic Review. *Nutrients*. 1 de abril de 2022;14(7):1471.
289. Pascucci T, Colamartino M, Fiori E, Sacco R, Coviello A, Ventura R, *et al.* P-cresol Alters Brain Dopamine Metabolism and Exacerbates Autism-Like Behaviors in the BTBR Mouse. *Brain Sci*. 13 de abril de 2020;10(4):233.
290. Macfabe D. Autism: metabolism, mitochondria, and the microbiome. *Glob Adv Health Med*. noviembre de 2013;2(6):52-66.
291. Ho LKH, Tong VJW, Syn N, Nagarajan N, Tham EH, Tay SK, *et al.* Gut microbiota changes in children with autism spectrum disorder: a systematic review. *Gut Pathog*. 2020;12:6.
292. David Moher, Alessandro Liberati, Jennifer Tezloff, Douglas G. Altman. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement [Internet]. 18 de agosto de 2009 [citado 18 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135>
293. Johnson N, Phillips M. Rayyan for systematic reviews. *Journal of Electronic Resources Librarianship* [Internet]. 1 de noviembre de 2017; Disponible en: [https://docs.lib.purdue.edu/lib\\_fsdocs/197](https://docs.lib.purdue.edu/lib_fsdocs/197)
294. Downes MJ, Brennan ML, Williams HC, Dean RS. Development of a critical appraisal tool to assess the quality of cross-sectional studies (AXIS). *BMJ Open*. 1 de diciembre de 2016;6(12):e011458.
295. Altieri L, Neri C, Sacco R, Curatolo P, Benvenuto A, Muratori F, *et al.* Urinary p-cresol is elevated in small children with severe autism spectrum disorder. *Biomarkers*. 1 de mayo de 2011;16(3):252-60.
296. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Elevated Fecal Short Chain Fatty Acid and Ammonia Concentrations in Children with Autism Spectrum Disorder. *Dig Dis Sci*. agosto de 2012;57(8):2096-102.
297. Kang DW, Ilhan ZE, Isern NG, Hoyt DW, Howsmon DP, Shaffer M, *et al.* Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*. febrero de 2018;49:121-31.
298. Kang DW, Adams JB, Vargason T, Santiago M, Hahn J, Krajmalnik-Brown R. Distinct Fecal and Plasma Metabolites in Children with Autism Spectrum Disorders and Their Modulation after Microbiota Transfer Therapy. *mSphere*. 21 de octubre de 2020;5(5):10.1128/msphere.00314-20.
299. Mussap M, Siracusano M, Noto A, Fattuoni C, Riccioni A, Rajula HSR, *et al.* The Urine Metabolome of Young Autistic Children Correlates with Their Clinical Profile Severity. *Metabolites*. 23 de noviembre de 2020;10(11):476.
300. Gevi F, Belardo A, Zolla L. A metabolomics approach to investigate urine levels of neurotransmitters and related metabolites in autistic children. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1 de octubre de 2020;1866(10):165859.
301. Timperio AM, Gevi F, Cucinotta F, Ricciardello A, Turriziani L, Scattoni ML, *et al.* Urinary Untargeted Metabolic Profile Differentiates Children with Autism from Their Unaffected Siblings. *Metabolites*. septiembre de 2022;12(9):797.
302. Turriziani L, Ricciardello A, Cucinotta F, Bellomo F, Turturo G, Boncoddio M, *et al.* Gut mobilization improves behavioral symptoms and modulates urinary p-cresol in chronically constipated autistic children: A prospective study. *Autism Research*. 2022;15(1):56-69.
303. Vernocchi P, Ristori MV, Guerrera S, Guarrasi V, Conte F, Russo A, *et al.* Gut Microbiota Ecology and Inferred Functions in Children With ASD Compared to Neurotypical Subjects. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2022 [citado 7 de septiembre de 2023];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.871086>
304. Lewis FM, Murdoch BE, Woodyatt GC. Linguistic abilities in children with autism spectrum disorder. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 1 de enero de 2007;1(1):85-100.
305. Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron*. 9 de diciembre de 2010;68(5):815-34.
306. Southan C, DeWolf WE, Kruse LI. Inactivation of dopamine beta-hydroxylase by p-cresol: evidence for a second, minor site of covalent modification at tyrosine 357. *Biochim Biophys Acta*. 9 de febrero de 1990;1037(2):256-8.
307. Kortenienmi J, Karlsson L, Aatsinki A. Systematic review: Autism spectrum disorder and the gut microbiota. *Acta Psychiatr Scand*. septiembre de 2023;148(3):242-54.
308. Mehra A, Arora G, Sahni G, Kaur M, Singh H, Singh B, *et al.* Gut microbiota and Autism Spectrum Disorder: From pathogenesis to potential therapeutic perspectives. *J Tradit Complement Med*. 8 de marzo de 2022;13(2):135-49.

309. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 1 de agosto de 2014;30(15):2114-20.
310. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. abril de 2012;9(4):357-9.
311. Tamames J, Puente-Sánchez F. SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis Pipeline. *Front Microbiol* [Internet]. 24 de enero de 2019 [citado 25 de junio de 2025];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.03349/full>
312. Bushmanova E, Antipov D, Lapidus A, Prjibelski AD. rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *Gigascience*. 1 de septiembre de 2019;8(9):giz100.
313. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 15 de marzo de 2011;27(6):863-4.
314. GitHub - tseemann/barrnap :microscope: Bacterial ribosomal RNA predictor [Internet]. [citado 25 de junio de 2025]. Disponible en: <https://github.com/tseemann/barrnap>
315. Laslett D, Canback B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*. 1 de enero de 2004;32(1):11-6.
316. Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. 8 de marzo de 2010;11(1):119.
317. Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 4 de enero de 2016;44(D1):D67-72.
318. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*. 1 de enero de 2000;28(1):27-30.
319. Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods*. enero de 2015;12(1):59-60.
320. Puente-Sánchez F, García-García N, Tamames J. SQMtools: automated processing and visual analysis of 'omics data with R and anvi'o. *BMC Bioinformatics*. 14 de agosto de 2020;21(1):358.
321. Alameddine J, Godefroy E, Papargyris L, Sarrabayrouse G, Tabiasco J, Bridonneau C, *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* Skews Human DC to Prime IL10-Producing T Cells Through TLR2/6/JNK Signaling and IL-10, IL-27, CD39, and IDO-1 Induction. *Front Immunol* [Internet]. 6 de febrero de 2019 [citado 25 de junio de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2019.00143/full>
322. Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., & *et al.* *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients [Internet]. 2008 [citado 25 de junio de 2025]. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
323. Zhang Q, Zou R, Guo M, Duan M, Li Q, Zheng H. Comparison of gut microbiota between adults with autism spectrum disorder and obese adults. *PeerJ*. 1 de marzo de 2021;9:e10946.
324. Lou M, Cao A, Jin C, Mi K, Xiong X, Zeng Z, *et al.* Deviated and early unsustainable stunted development of gut microbiota in children with autism spectrum disorder. *Gut*. 1 de agosto de 2022;71(8):1588-99.
325. Wang Y, Li N, Yang JJ, Zhao DM, Chen B, Zhang GQ, *et al.* Probiotics and fructo-oligosaccharide intervention modulate the microbiota-gut brain axis to improve autism spectrum reducing also the hyper-serotonergic state and the dopamine metabolism disorder. *Pharmacol Res*. julio de 2020;157:104784.
326. Kałużna-Czaplińska J, Błaszczuk S. The level of arabinitol in autistic children after probiotic therapy. *Nutrition*. febrero de 2012;28(2):124-6.
327. He X, Liu W, Tang F, Chen X, Song G. Effects of Probiotics on Autism Spectrum Disorder in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Nutrients*. 15 de marzo de 2023;15(6):1415.
328. Oono IP, Honey EJ, McConachie H. Parent-mediated early intervention for young children with autism spectrum disorders (ASD) - Oono, IP - 2013 | Cochrane Library. [citado 24 de junio de 2025]; Disponible en: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009774.pub2/full>
329. Reichow B, Hume K, Barton EE, Boyd BA. Early intensive behavioral intervention (EIBI) for young children with autism spectrum disorders (ASD) - Reichow, B - 2018 | Cochrane Library. [citado 24 de junio de 2025]; Disponible en: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009260.pub3/full>





## ANEXO

Este apartado incluye una lista de todos los artículos publicados por María Isabel Serrano Tomás durante su tiempo realizando el programa de Doctorado, relacionado o no con esta Tesis.

García-Caballero, A., de Dios Caballero, J., Maruri, A., **Serrano-Tomás, M. I.**, Del Campo, R., Morosini, M. I., & Cantón, R. (2022). Evaluation of different phenotypic methods to detect methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cystic fibrosis patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *102*(1), 115559. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115559>.

Pérez-Viso, B., Hernández-García, M., Rodríguez, C. M., D Fernández-de-Bobadilla, M., **Serrano-Tomás, M. I.**, Sánchez-Díaz, A. M., Avendaño-Ortiz, J., Coque, T. M., Ruiz-Garbajosa, P., Del Campo, R., & Cantón, R. (2024). A long-term survey of *Serratia* spp. bloodstream infections revealed an increase of antimicrobial resistance involving adult population. *Microbiology spectrum*, *12*(2), e0276223. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02762-23>.

**Serrano-Tomás, M. I.**, Cabello, M., Moreno-Nuñez, P., Sanz, J. C., Cantón, R., & Sánchez-Díaz, A. M. (2025). Invasive pneumococcal disease in a tertiary hospital in Madrid: are we using pneumococcal vaccine correctly?. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)*, *43*(4), 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2025.03.009>.

**Serrano-Tomás, M. I.**, Contreras-Romero, P., Parellada, M., Chaves-Cordero, J., Zamora, J., Hengst, M., Pozo, P., Del Campo, R., & Guzmán-Salas, S. (2025). Recognition of the microbial metabolite *p*-cresol in autism spectrum disorder: systematic review and meta-analysis. *Frontiers in molecular neuroscience*, *18*, 1576388. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2025.1576388>.

