

ARTÍCULO ORIGINAL

El ácido fólico mejora la comunicación verbal en niños con autismo y trastornos del lenguaje: un ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo

RE Frye^{1,2,3}, J. Slattery^{2,3}, L Delhey^{2,3}, B Furgerson¹, Strickland¹, M. Tippet^{1,2}, A Sailey^{2,3}, R Wynne^{2,3}, S rosa^{2,3}, S. Melnyk^{2,3}, S Jill James^{2,3}, JM Sequeira⁴ y EV Quadros⁴

Intentamos determinar si el ácido fólico en dosis altas mejora la comunicación verbal en niños con trastorno del espectro autista (TEA) no sintomático y deterioro del lenguaje en un entorno de control de placebo doble ciego. Cuarenta y ocho niños (edad media 7 años 4 meses; 82 % varones) con TEA y trastornos del lenguaje se aleatorizaron para recibir 12 semanas de ácido fólico en dosis altas (2 mg kg⁻¹ por día, máximo 50 mg por día; n=23) o placebo (n=25). Los niños fueron subtipificados según el estado de autoanticuerpos del receptor alfa de glutatión y folato (FRAA). La mejora en la comunicación verbal, medida por un instrumento estandarizado apropiado para la capacidad, fue significativamente mayor en los participantes que recibieron ácido fólico en comparación con los que recibieron placebo, lo que resultó en un efecto de 5,7 (1,0, 10,4) puntos estandarizados con una media a grande. tamaño del efecto (de Cohen's $d=0,70$). El estado de FRAA predijo la respuesta al tratamiento. Para los participantes positivos para FRAA, la mejora en la comunicación verbal fue significativamente mayor en los que recibieron ácido fólico en comparación con los que recibieron placebo, lo que resultó en un efecto de 7.3 (1.4, 13.2) puntos estandarizados con un tamaño de efecto grande (Cohen's $d=0,91$), lo que indica que el tratamiento con ácido fólico puede ser más eficaz en niños con TEA que son FRAA positivos. Las mejoras en las subescalas de Vineland Adaptive Behavior Scale, Aberrant Behavior Checklist, Autism Symptom Questionnaire y Behavioral Assessment System for Children fueron significativamente mayores en el grupo de ácido fólico en comparación con el grupo de placebo. No hubo diferencias significativas en los efectos adversos entre los grupos de tratamiento. Por lo tanto, en este pequeño ensayo de niños con TEA no sintomático y deterioro del lenguaje, el tratamiento con dosis altas de ácido fólico durante 12 semanas dio como resultado una mejora en la comunicación verbal en comparación con el placebo, particularmente en aquellos participantes que tenían FRAA positivos.

Psiquiatría Molecular publicación anticipada en línea, 18 de octubre de 2016; doi:10.1038/mp.2016.168

INTRODUCCIÓN

El trastorno del espectro autista (TEA) es un trastorno definido por el comportamiento cuya etiología sigue siendo poco conocida. Estimaciones recientes sugieren que hasta el 2% de los niños en los Estados Unidos se ven afectados por un ASD.¹ Investigaciones recientes han descubierto anomalías fisiológicas asociadas,^{2,3} pero los ensayos clínicos de alta calidad que investigan tratamientos biológicos dirigidos siguen siendo limitados.^{4,5} Por lo tanto, se necesita con urgencia el desarrollo y la investigación de tratamientos que aborden las anomalías fisiopatológicas subyacentes y los síntomas centrales y asociados.⁴

Varias anomalías en el metabolismo del folato, una vitamina B esencial soluble en agua, se han relacionado con el TEA.⁶ El TEA está asociado con polimorfismos en los genes de la vía relacionada con el folato y las interrupciones en el metabolismo relacionado con el folato pueden estar relacionadas con anomalías del glutatión asociadas con el TEA (Figura complementaria S1).⁷ Se ha demostrado que la suplementación con folato durante los períodos prenatal y de concepción reduce el riesgo de TEA en la descendencia.^{8–10}

El folato se transporta principalmente a través del epitelio del plexo coroideo unido al receptor de folato α (FR α) mediante endocitosis dependiente de energía (Figura complementaria S1).¹¹ Deficiencia de folato cerebral, un trastorno en el que las concentraciones de folato están por debajo de lo normal en el líquido cefalorraquídeo (LCR) pero no en la sangre,

se describió por primera vez en seis niños con regresión del neurodesarrollo y anomalías neurológicas. El tratamiento con ácido fólico, una forma reducida de folato, normalizó las concentraciones de folato en LCR y mejoró significativamente los síntomas neurológicos.¹² Otras descripciones de casos demostraron que muchos de los niños con deficiencia cerebral de folato tenían TEA y que el tratamiento con ácido fólico mejoró los síntomas del TEA, así como otros síntomas neurológicos.^{5,11,13–15} Curiosamente, también se ha descubierto que las personas con síndrome de Rett, un trastorno estrechamente relacionado con el TEA, tienen deficiencia de folato cerebral.^{16–18}

La disfunción FR α se relacionó por primera vez con los autoanticuerpos FR α (FRAA)¹¹ con informes posteriores que también vinculan la disfunción de FR α con la enfermedad mitocondrial.^{19–22} Un hallazgo intrigante es que las mutaciones genéticas en el gen FOLR1, que es el gen de FR α , rara vez explican la deficiencia de folato cerebral.²³ Dos tipos de FRAA, bloqueantes y vinculantes, alteran el transporte de folato²⁴ y los títulos séricos del bloqueante FRAA se han correlacionado con las concentraciones de folato en LCR en estudios independientes.^{24,25} El bloqueo de FRAA interfiere directamente con la unión de folato a FR α mientras que la unión de FRAA se une a FR α y desencadena una reacción inmunitaria mediada por anticuerpos.^{26,27}

La presencia de alteraciones del folato central en los TEA está respaldada por varios estudios.

¹Hospital Infantil de Arkansas, Little Rock, AR, EE. UU.; ²Instituto de Investigación Infantil de Arkansas, Little Rock, AR, EE. UU.; ³Departamento de Pediatría, Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas, Little Rock, AR, EE. UU. ⁴Departamento de Medicina, Universidad Estatal de Nueva York – Centro Médico Downstate, Brooklyn, NY, EE. UU. Correspondencia: Dr. RE Frye, Programa de Investigación del Autismo, Instituto de Investigación Infantil de Arkansas, Slot 512-41B, 13 Children's Way, Little Rock 72202, AR, EE. UU.

Correo electrónico: REFrye@uams.edu

Recibido el 20 de mayo de 2016; revisado el 1 de agosto de 2016; aceptado el 3 de agosto de 2016

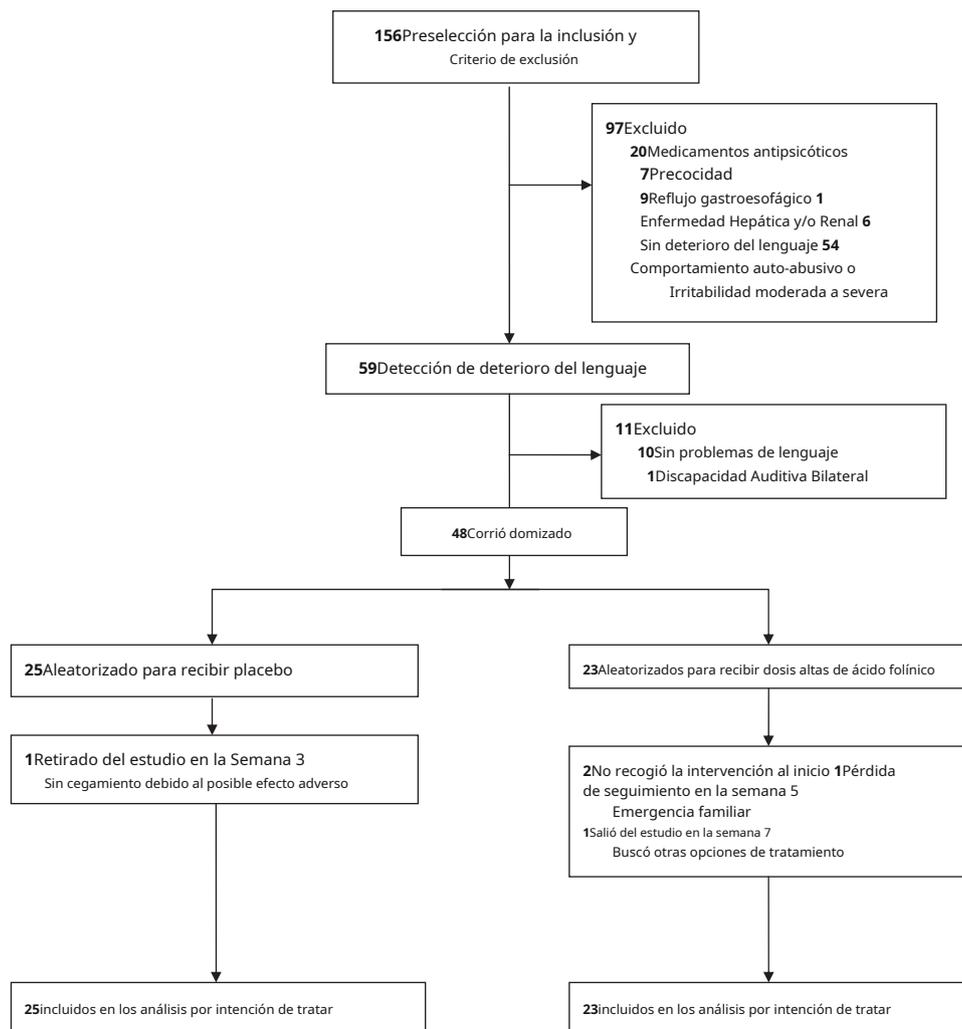


Figura 1. Diagrama de flujo de los participantes a lo largo del ensayo.

De 93 niños con ASD, el 60 y el 44 % fueron positivos para bloquear y unir FRAA, respectivamente.²⁴ Otro estudio que examinó solo el bloqueo de FRAA en niños con TEA confirmó esta alta prevalencia.²⁸ Estas tasas son claramente más altas que la prevalencia del 4 al 15% informada en adultos sanos.^{24y} el 3% de prevalencia informado en niños no autistas con retraso en el desarrollo.²⁸ Curiosamente, un estudio reciente en animales sugirió que los FRAA pueden alterar el metabolismo del folato durante la gestación, lo que resulta en comportamientos similares a los TEA en la descendencia.²⁹ Más recientemente, se informó que hasta el 23 % de los niños con TEA que se sometieron a una punción lumbar tenían concentraciones anormalmente bajas de folato en el LCR.³⁰

El transportador de folato reducido es un mecanismo secundario que transporta folatos reducidos, como el ácido fólico, a través de la barrera hematoencefálica, aunque se requieren concentraciones séricas altas ya que el transportador de folato reducido tiene una menor afinidad por el folato (es decir, concentraciones micromolares) que el FRα (es decir, concentraciones nanomolares, figura complementaria S1A).^{11,24} Los informes de casos y las series señalan que las dosis altas de ácido fólico mejoran notablemente los síntomas en niños con TEA y concentraciones bajas de folato en el LCR.^{11,24} En un estudio abierto controlado, encontramos que los niños con TEA que dieron positivo en al menos un FRAA experimentaron mejoras significativas en la comunicación verbal, el lenguaje receptivo y expresivo, la atención y el comportamiento estereotípico con dosis altas (2 mg kg⁻¹ por día en dos dosis divididas;

máximo 50 mg por día) tratamiento con ácido fólico con muy pocos efectos adversos informados.²⁴

Para determinar si el ácido fólico en dosis altas puede mejorar los síntomas centrales y asociados del TEA, llevamos a cabo un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo en un solo lugar. Se planteó la hipótesis de que altas dosis de ácido fólico aliviarían los síntomas del TEA, particularmente en niños con anomalías metabólicas relacionadas con el folato. Además, buscamos determinar si los biomarcadores de alteraciones en el metabolismo del folato, como el FRAA, podrían predecir qué niños responderían al tratamiento con ácido fólico, de modo que pudieran evitarse los procedimientos de diagnóstico invasivos, como la punción lumbar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas (Little Rock, AR, EUA). Los padres de los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

Diseño del estudio

Este estudio paralelo controlado con placebo, aleatorizado, doble ciego, de dos brazos con una asignación 1:1 se realizó en el Arkansas Children's Research Institute (Little Rock, AR, EE. UU.) del 4 de junio de 2012 al 22 de noviembre de 2013.

Los participantes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión fueron evaluados por problemas de lenguaje. Preverbal (o25 palabras funcionales) niños calificados

Tabla 1. Características demográficas y clínicas por grupo de tratamiento^a

Variable	ácido fólico (norte =23)	placebo (norte =25)
Edad, media (sd), años meses	7 años 7 meses (3 años 6 meses)	7 años 2 meses (2 años 10 meses)
Varones, norte (%)	18 (78)	20 (80)
Número de dosis olvidadas	0,2 (0,3)	0,6 (1,3)
Compuesto de comportamiento adaptativo de Vineland, media (sd)	64,79 (7,25)	65,84 (9,20)
Terapia total, minutos por semana, media (sd) Terapia total, minutos por semana, mediana (mín; máx) Terapia del habla, minutos por semana, media (sd) Terapia conductual, minutos por semana, media (sd) Terapia motora, minutos por semana, media (sd)	339,52 (498,32) 195 (0; 2070) 99,52 (63,26) 133,57 (409,75) 103,57 (133,31)	500,80 (591,56) 300 (0; 2790) 220,00 (377,77) 214,80 (569,58) 137,60 (95,98)
Autoanticuerpo receptor de folato positivo, N (%)	13 (57)	18 (72)
Título de bloqueo (pmol ml ⁻¹), media (sd) Título de bloqueo (pmol ml ⁻¹), mediana (mín; máx.) Título de unión (pmol ml ⁻¹), media (sd) Título de unión (pmol ml ⁻¹), mediana (mín.; máx.) Relación redox de glutatión, media (DE)	0,08 (0,20) 0,00 (0,00, 0,86) 0,39 (0,74) 0,00 (0,00; 2,46) 9,21 (2,40)	0,06 (0,15) 0,00 (0,00; 0,55) 0,61 (0,73) 0,38 (0,00; 2,46) 9,09 (1,72)
Folato (ng ml ⁻¹) (normal 5–21), media (sd) B12 (pg ml ⁻¹) (normal 200–900), media (sd) Zinc (mg dl ⁻¹) (normal 65–120), media (sd) Cobre (µg dl ⁻¹) (normal 70–128), media (sd) Magnesio (µg g ⁻¹) (normal 39–59 l), media (sd)	17,15 (3,41) 859,79 (447,54) 109,64 (31,64) 103,10 (12,56) 42,15 (10,60)	17,79 (2,42) 725,39 (368,06) 99,00 (19,29) 109,19 (17,07) 47,77 (11,50)
Pruebas de idioma, N (%)		
Preverbal al inicio del estudio	8 (35)	11 (44)
Escalas de Lenguaje Preescolar	3 (14)	5 (20)
Evaluación Clínica de Fundamentos del Lenguaje 2	14 (62)	12 (48)
Evaluación Clínica de Fundamentos del Lenguaje 4	6 (26)	8 (32)
Documentación diagnóstica, N (%)		
Acuerdo del médico de la Lista 3 de observación de diagnóstico de autismo	12 (52)	16 (64)
Profesional único con cuestionarios estandarizados ^b	18 (78)	21 (84)
	2 (9)	1 (4)
Entrevista de Diagnóstico de Autismo-Revisada		
Participó en las pruebas de confirmación, norte (%) Puntuación de interacción social, media (sd) [rango] Puntuación de comunicación: Verbal, media (sd) [rango] Puntuación de comunicación: No verbal, media (sd) [rango] Puntuación de juego restringido y repetitivo, media (sd) [rango] Puntaje resumido, media (sd) [rango]	19 (83) 20,50 (5,50) [10–27] 17,00 (3,92) [10–22] 12,80 (2,68) [8–14] 4,78 (1,86) [2–9] 4,22 (1,06) [2–5]	21 (84) 23,80 (4,80) [11–30] 19,00 (5,16) [7–25] 13,40 (0,52) [13–14] 6,40 (2,08) [2–12] 4,25 (0,91) [3–5]
Medicamentos (tratamientos concurrentes), N (%)		
Estimulante	6 (26)	6 (24)
melatonina	6 (26)	5 (20)
Medicamentos para alergias/asma	4 (17)	7 (28)
Medicamentos gastrointestinales	4 (17)	5 (20)
Agonistas alfa-adrenérgicos	5 (22)	3 (12)
Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina	3 (13)	1 (4)
Medicamentos antiepilépticos	2 (9)	2 (8)
Medicamentos antimicrobianos	3 (13)	0 (0)
Medicamentos inmunomoduladores	1 (4)	0 (0)
Suplementos (tratamientos concurrentes), N (%)		
Multivitamina	3 (13)	11 (44)
Minerales	4 (17)	3 (12)
Vitamina B12	2 (9)	4 (16)
Otras vitaminas B	2 (9)	2 (8)
Ácidos grasos	1 (4)	3 (12)
Otros antioxidantes	1 (4)	2 (8)
folato	0 (0)	3 (12)
carnitina	1 (4)	1 (4)
Coenzima Q10	1 (4)	0 (0)
Aminoácidos	1 (4)	0 (0)
Otras vitaminas	0 (0)	1 (4)
Condiciones médicas comórbidas, N (%)		
Trastornos alérgicos	9 (39)	12 (48)
Trastornos gastrointestinales	9 (39)	10 (40)
Trastornos neurológicos	6 (26)	10 (40)

Tabla 1. (Continuación)

Variable	ácido fólico (norte =23)	placebo (norte =25)
Trastornos del sueño	4 (17)	8 (32)
Otros trastornos psiquiátricos	6 (26)	4 (16)
Anomalía inmunitaria	8 (35)	5 (20)
Malformaciones congénitas leves	1 (4)	1 (4)
Trastornos genéticos ^a	1 (4)	0 (0)

Valores medios con desviación estándar entre paréntesis y rango entre paréntesis. Las medidas de resultado iniciales descritas en la Tabla 1 no fueron significativamente diferentes entre los grupos de tratamiento. Los cuestionarios estandarizados incluyeron la Escala de Respuesta Social, el Cuestionario de Comunicación Social y/o el Cuestionario de Síntomas de Autismo. Las anomalías inmunitarias incluyen infección crónica del oído en 9 (19 %) de los participantes (6 (26 %) con placebo, 3 (12 %) con ácido fólico), infecciones del tracto urinario en 2 (4 %) de los participantes (1 (4 %) con placebo, 1 (4%) ácido fólico), infecciones crónicas en 2 (4%) de los participantes (0 (0%) placebo, 2 (8%) ácido fólico), trastorno inmunológico en 1 (2%) de los participantes (1 (4%) placebo, 0 (0%) ácido fólico), hipertrofia adenoamigdal en 1 (2%) de los participantes (1 (4%) placebo, 0 (0%) ácido fólico) y PANDAS/PANS en 1 (2 %) de los participantes (1 (4%) placebo, 0 (0%) ácido fólico). Durante el estudio, se descubrió que un niño tenía una mutación del gen homólogo de fosfatasa y tensina.

Tabla 2A. Análisis estadístico de la medida de resultado primaria del análisis de modelo mixto de comunicación verbal (puntuación estandarizada, se muestra el intervalo de confianza del 95 %)

	norte	ácido fólico		Placebo		Efecto estimado ^a	Tamaño del efecto ^b	PAGS-valor
		Base	12 semanas	Base	12 semanas			
General	48	58,1 (53,9, 62,1)	65,4 (60,6, 70,2)	56,8 (51,5, 62,2)	58,5 (51,9, 65,1)	5,7 (1,0, 10,4)	0.70	0.02
Estado de anticuerpos								
Negativo	17	57,9 (50,6, 65,2)	64,5 (57,3, 71,7)	48,0 (45,5, 50,5)	52,1 (45,5, 58,8)	2,5 (-5,9, 10,9)	0.30	0.58
Positivo	31	58,1 (52,9, 63,3)	66,1 (59,0, 73,1)	60,3 (53,5, 67,0)	60,9 (52,2, 69,6)	7.3 (1.4, 13.2)	0.91	0.02
Proporción de glutatión								
Alto	24	59,2 (53,6, 64,8)	65,0 (58,4, 71,6)	55,1 (47,1, 63,1)	58,1 (50,0, 66,2)	3,0 (-2,5, 8,5)	0,46	0.30
Bajo	24	56,1 (49,6, 62,7)	66,0 (58,2, 73,8)	58,0 (50,5, 65,5)	58,7 (28,7, 68,7)	9,1 (0,9, 17,3)	0,95	0.04

^aEfecto estimado del tratamiento con ácido fólico con intervalo de confianza del 95%. El efecto estimado es la diferencia en las medidas de resultado entre el grupo de ácido fólico y el de placebo según lo estimado por la regresión de modelo mixto. ^bde Cohend tamaño del efecto es una medida de la fuerza del efecto de la intervención con ácido fólico. Los valores más altos representan efectos más fuertes. Para los Cohend, 0,25 es un efecto pequeño, 0,5 es un efecto medio y 0,8 es un efecto grande.

como alteración del lenguaje. De lo contrario, la versión apropiada para la edad de la Evaluación Clínica de los Fundamentos del Lenguaje (CELF) confirmó el deterioro del lenguaje. El deterioro del lenguaje se definió como una puntuación estandarizada centralo85 si se usó la versión preescolar o falla en el evaluador CELF si se usaron otras versiones.

Aquellos que tenían problemas de lenguaje confirmados fueron aleatorizados al grupo de ácido fólico o placebo y se obtuvo una muestra de sangre en ayunas. La aleatorización se realizó mediante un generador de números aleatorios con un tamaño de bloque de cuatro. Los farmacéuticos investigadores tenían acceso exclusivo a la asignación aleatoria. Después del desayuno, los participantes regresaron para evaluaciones de lenguaje, desarrollo y comportamiento. Después de estas evaluaciones, se le dio a la familia las 12 semanas de la intervención y se le instruyó sobre su administración. Las evaluaciones de lenguaje, desarrollo y comportamiento se repitieron después de 12 semanas de tratamiento.

Se solicitaron cuestionarios para padres y maestros al inicio y 6 y 12 semanas después de comenzar el tratamiento. Se pidió a los padres que entregaran cuestionarios de referencia a los maestros o terapeutas. Después de la primera visita, los cuestionarios se enviaron por correo a los padres y maestros al menos 1 semana antes de la fecha prevista de finalización. Se les pidió a los padres que trajeran los cuestionarios de 12 semanas para padres y maestros completados a la evaluación final. Otros cuestionarios fueron devueltos en un sobre con franqueo pagado.

Intervención

La dosis objetivo de la intervención (DCI: DL ácido fólico sal cálcica; USAN: leucovorina cálcica) fue de 2 mg kg⁻¹ por día (máximo 50 mg por día) en dos dosis divididas en partes iguales con la mitad de la dosis objetivo administrada durante las primeras 2 semanas. Lee Silsby Compounding Pharmacy (Cleveland Heights, OH, EE. UU.) proporcionó cápsulas vegetarianas sin colorantes ni productos lácteos en tres concentraciones (5, 10 y 25 mg). Un servicio analítico independiente (Eagle Analytical Services, Houston, TX, EE. UU.) proporcionó un certificado de análisis para cada lote de cápsulas producido. En todos los casos, la potencia fue de al menos el 99%.

Para verificar que las cápsulas de ácido fólico y las de placebo no se distinguían a simple vista ni al tacto, se pidió a 10 científicos, 10 miembros del personal médico y 10 padres de niños con TEA que no participaron en el estudio que clasificaran ocho pequeñas bolsas de plástico numeradas, cada una con dos cápsulas de la misma potencia, en dos grupos (placebo y ácido fólico) de cuatro según la similitud de la cápsula. Nadie fue capaz de clasificar con precisión estas bolsas (BinomialPAG =0,04). Se indicó a los padres que las cápsulas se podían abrir y agregar el polvo a los alimentos o bebidas si el niño tenía dificultades para tragar el medicamento. Tanto el placebo como el ácido fólico en polvo eran inodoros e insípidos. Ningún padre o niño comentó sobre el olor o el sabor del medicamento, lo que proporcionó más evidencia de la naturaleza insípida e inodora del tratamiento.

Se preguntó a los padres sobre las dosis olvidadas y se examinó el cumplimiento de los envases de píldoras devueltos, que calculó la farmacia de investigación.

Los criterios de inclusión y exclusión

Los participantes fueron reclutados de nuestro registro de investigación (48 %), clínica de autismo (23 %), anuncios comunitarios y redes sociales (13 %), boca a boca (10 %) y referencias médicas (2 %). El diagnóstico de TEA se definió por uno de los siguientes: (i) un instrumento de diagnóstico estándar de oro, como el Programa de observación de diagnóstico de autismo y/o la Entrevista de diagnóstico de autismo revisada; (ii) el estándar de diagnóstico del estado de Arkansas, definido como el acuerdo de un médico, un psicólogo y un terapeuta del habla; y/o (iii) Diagnóstico del Manual Estadístico de Diagnóstico (DSM) realizado por un médico junto con cuestionarios validados estandarizados y confirmación del diagnóstico por parte del Investigador Principal. Se solicitó a todos los participantes la reconfirmación del diagnóstico utilizando la versión de por vida de la Entrevista de diagnóstico de autismo revisada por un evaluador confiable de investigación independiente.

Los criterios de inclusión incluyeron: (i) edad de 3 a 14 años; (ii) documentación de problemas de lenguaje; (iii) terapia complementaria, tradicional, conductual y educativa sin cambios 8 semanas antes de la inscripción; y (iv) la intención de mantener constantes las terapias en curso durante todo el ensayo.

Tabla 2B. Análisis estadístico de la medida de resultado primaria del análisis de respuesta a la comunicación verbal^a

	tratamiento con ácido fólico ^{b,c}	tratamiento con placebo ^{b,d}	% Diferencia de respondedores	Odds ratio sin ajustar yPAGS-valor	Razón de probabilidades ajustada yPAGS-valor	Número necesario a tratar
General	15 65% (46%, 84%)	6 24% (7%, 41%)	41% (13%, 63%)	5,9 (1,7, 20,9)	14,9 (2,1, 116,9)	2,4 (1,6, 7,7)
Estado de anticuerpos						
Negativo	5 50 % (19 %, 81 %)	2 29 % (-4 %, 62 %) 4	21 % (-27 %, 60 %)	2,5 (0,3, 19,5)	3,6 (0,1, 95,6)	4,7 (1,5, - 4,1)
Positivo	10 77 % (54 %, 99 %)	22 % (3 %, 41 %)	55% (19%, 78%)	11,7 (2,1, 64,0)	67,4 (5,6, 999,9)	1,8 (1,3, 5,2)
Proporción de glutatión						
Alto	9 64 % (39 %, 89 %) 6	3 30% (2%, 58%)	34 % (-4 %, 72 %)	4,2 (0,73, 23,9)	21,9 (1,9, 956,9)	2,9 (1,4, - 27,6)
Bajo	67 % (36 %, 98 %)	3 20% (0%, 40%)	47% (10%, 84%)	8,0 (1,2, 52,2)	10,2 (1,4, 140,6)	2,1 (1,2, 10,2)

^aLa respuesta se define como un aumento de cinco puntos estandarizados en el resultado principal, que se midió utilizando las Escalas de lenguaje preescolar-5, la Evaluación clínica de los fundamentos del lenguaje preescolar-2 o la Evaluación clínica de los fundamentos del lenguaje 4.³⁸Número de respondedores (% de respondedores (95% intervalo de confianza)).^cGeneraln=23; anticuerpos negativos = 10; anticuerpo positivo = 13; glutatión alto = 14; Glutatión bajo = 9.^dGlutatión alto = 9; anticuerpos negativos = 7; anticuerpos positivos = 18; glutatión alto = 10; Glutatión bajo = 15.

Los criterios de exclusión incluyeron: (i) medicamentos antipsicóticos; (ii) suplementación que exceda la cantidad diaria recomendada; (iii) prematuridad; (iv) reflujo gastroesofágico no controlado; (v) antecedentes de enfermedad hepática o renal; (vi) medicamentos que se sabe que afectan el metabolismo del folato (ver Material complementario); (vii) profundos déficits sensoriales; (viii) síndromes genéticos bien definidos; (ix) mutaciones genéticas conocidas por afectar significativamente las vías asociadas al folato; (x) malformaciones o daños cerebrales encontrados en imágenes de resonancia magnética; (xi) terapias en curso que podrían interferir con el estudio; (xii) una convulsión clínica en los últimos 6 meses; y (xiii) irritabilidad de moderada a severa o comportamiento autoabusivo en la lista de verificación de comportamiento aberrante.

Medidas de resultado

Todos los resultados primarios y secundarios se obtuvieron al inicio y al final del estudio. También se solicitaron cuestionarios a las 6 semanas de iniciada la intervención. Aparte de los farmacéuticos de investigación, el personal del estudio, los participantes, los padres y los maestros desconocían la asignación del tratamiento.

Resultado primario. La comunicación verbal fue el resultado primario por varias razones. Primero, la comunicación verbal mejoró en los estudios preliminares de tratamiento con ácido fólico.²⁴ En segundo lugar, la comunicación verbal en los niños con TEA está estrechamente relacionada con la calidad de vida de los padres.³¹ En tercer lugar, el desarrollo de las habilidades del lenguaje y la comunicación se asocia con resultados favorables.³²⁻³⁴

Debe reconocerse que el deterioro de la comunicación se consideraba una característica central de los TEA hasta el DSM-V, que ahora ha combinado los síntomas sociales y de comunicación en un grupo de síntomas de comunicación social. En el DSM-V la alteración del lenguaje se reconoce como una comorbilidad significativa interrelacionada con el diagnóstico de TEA.

La comunicación verbal se evaluó mediante un instrumento apropiado para la capacidad. Los instrumentos utilizados fueron el CELF-preescolar-2, CELF-4 y la Escala de Lenguaje Preescolar-5 (PLS-5). El CELF es un instrumento estandarizado y bien validado que evalúa habilidades anormales en los TEAs³⁵ y se ha utilizado en estudios centrados en la comunicación verbal en los TEA.^{36,37}

El PLS-5 es un instrumento estandarizado y bien validado que mide cambios sutiles en la comunicación verbal, particularmente en niños preverbales.³⁸ La puntuación de resumen estandarizada de cada instrumento (media 100, desviación estándar 15) fue la medida de resultado primaria y varía de 50 a 150 para el PLS-5 y de 45 a 155 para el CELF.

El instrumento apropiado para la capacidad se seleccionó mediante un algoritmo estructurado. El objetivo fue seleccionar un instrumento con un rango dinámico adecuado para evaluar la mejora en la comunicación verbal. La evaluación comenzó con el instrumento más apropiado para la edad.

Si el niño obtuvo una puntuación en el piso, se utilizó el siguiente instrumento de menor capacidad. Este proceso se repitió hasta que se pudo obtener una puntuación por encima del suelo. La puntuación del instrumento final fue la medida de resultado primaria al inicio y al final del ensayo. Si la edad del niño excedía la edad máxima de estandarización del instrumento, se utilizaba la edad máxima estandarizada. Al final del ensayo, todos los instrumentos utilizados durante la evaluación inicial se repitieron en el mismo orden para simular la misma experiencia de evaluación inicial y minimizar un posible factor de confusión de la fatiga cognitiva.

Los estudios han demostrado que la terapia conductual temprana mejora la comunicación verbal en una desviación estándar durante 36 semanas.^{39,40} Por lo tanto, un cambio clínicamente significativo se definió como un aumento de 5 puntos en la comunicación verbal en este estudio de 12 semanas, ya que el resultado primario tiene una desviación estándar de 15 puntos. Examinar el error estándar de los participantes en el estudio actual sugiere que una diferencia clínicamente importante mínima es de 2 puntos.

Resultados secundarios. Las medidas de resultado secundarias incluyeron la Escala de Impresión Clínica del Autismo de Ohio (OACIS), el Formulario de Entrevista de la Encuesta de la Segunda Edición de la Escala de Comportamiento Adaptativo de Vineland (VABS) y varios cuestionarios. Se pidió a los padres y maestros que completaran la Lista de Verificación de Comportamiento Aberrante (ABC), la Escala de Respuesta Social (SRS) y el Sistema de Evaluación del Comportamiento para Niños 2da Edición (BASC). Solo a los padres se les pidió que completaran la Medida de Impacto del Autismo (AIM) y el Cuestionario de Síntomas del Autismo (ASQ).

La OACIS es una escala calificada por un observador sensible a cambios clínicamente significativos en los síntomas del TEA.⁴¹ Primero se desarrolló como la escala de calificación de autismo de la Universidad Estatal de Ohio.⁴² Se ha demostrado que tiene una buena confiabilidad entre evaluadores y transculturales⁴³ y se ha utilizado con éxito en varios ensayos clínicos de ASD.⁴⁴⁻⁴⁷ El primer autor calificó la gravedad de cada síntoma al inicio y en la evaluación final mediante la observación de todo el

Tabla 3. Medidas de resultado secundarias

Medida	evaluación de 12 semanas				Efecto estimado ^c	MCID ^d	PAGS-vaib ^{mi}
	Base	Ácido fólico, Media (IC ₉₅)	Placebo, media (IC ₉₅)	Placebo, media (IC ₉₅)			
Escala de comportamiento adaptativo de Vineland (puntuación estándar; puntuaciones más altas = mejor rendimiento)							
Comunicación	66,2 (62,0, 70,4)	65,9 (60,8, 71,1)	68,3 (63,5, 73,2)	66,0 (59,8, 72,2)	0,2 (0,4, -0,2)	3,8	0,87
La vida diaria	64,6 (61,2, 68,0)	68,1 (62,5, 73,7)	69,2 (64,4, 74,0)	66,3 (60,3, 72,3)	0,5 (0,0, 1,0)	2,8	0,25
Habilidades sociales	64,4 (60,8, 68,0)	66,1 (61,9, 70,4)	68,3 (64,2, 72,5)	67,4 (61,7, 73,2)	0,2 (-0,2, 0,6)	3,0	0,29
Habilidades motoras	78,9 (72,5, 85,3)	78,5 (73,0, 84,0)	81,7 (75,3, 88,2)	80,6 (74,5, 86,7)	0,1 (-0,1, 0,3)	4,4	0,69
Comportamiento adaptativo	64,8 (61,6, 68,0)	65,8 (62,0, 69,7)	67,7 (63,7, 71,7)	65,8 (60,8, 70,8)	0,3 (0,7, -0,1)	2,4	0,16
Lista de verificación de comportamiento aberrante (puntuación bruta); puntuaciones más bajas = menos problemas de comportamiento							
Irritabilidad	13,4 (10,3, 16,5)	10,2 (7,5, 13,0)	9,1 (7,1, 11,0)	8,5 (5,7, 11,4)	-1,2 (-0,2, -2,2)	1,8	0,04
Letargo	13,1 (10,8, 15,4)	13,1 (9,9, 16,2)	9,7 (7,2, 12,2)	11,1 (7,7, 14,6)	-1,4 (-1,0, -1,9)	1,0	0,02
Comportamiento estereotipado	6,1 (4,5, 7,7)	7,3 (5,2, 9,5)	3,7 (2,5, 5,0)	7,1 (5,1, 9,1)	-0,9 (-0,4, -1,4)	0,7	0,007
Hiperactividad	25,0 (21,8, 28,1)	18,5 (13,5, 23,5)	22,1 (17,5, 26,4)	16,0 (11,6, 20,4)	-1,8 (-0,6, -3,0)	2,6	0,02
Habla inapropiada	5,2 (3,8, 6,6)	4,1 (2,6, 5,6)	4,0 (3,0, 5,0)	3,8 (2,6, 5,1)	-1,7 (-0,9, -2,5)	0,7	0,004
Puntaje total	62,7 (54,9, 70,6)	53,2 (43,2, 63,2)	48,5 (40,9, 56,1)	46,6 (35,9, 57,2)	-4,7 (-3,0, -6,4)		0,02
Escala de impresión clínica del autismo de Ohio (gravedad): puntuaciones más bajas = menos gravedad y mayor mejora							
Social	4,3 (4,0, 4,6)	4,4 (4,0, 4,8)	3,8 (3,3, 4,4)	4,0 (3,4, 4,5)	-0,1 (-0,3, 0,1)	0,4	0,52
Comportamiento aberrante	3,8 (3,3, 4,2)	3,6 (3,2, 4,0)	3,4 (2,9, 3,8)	3,5 (3,0, 4,0)	-0,3 (-0,6, 0,0)	0,4	0,32
Comportamiento repetitivo	3,2 (2,8, 3,5)	2,8 (2,3, 3,3)	2,5 (2,2, 2,8)	2,7 (2,2, 3,2)	-0,4 (-0,8, 0,0)	0,4	0,13
Comunicación verbal	4,4 (3,9, 4,8)	4,7 (4,1, 5,3)	3,8 (3,2, 4,3)	4,3 (3,7, 5,0)	-0,2 (-0,6, 0,2)	0,4	0,37
Comunicación no verbal	3,6 (3,2, 4,0)	3,8 (3,3, 4,4)	3,3 (2,8, 3,8)	3,5 (3,0, 4,1)	-0,0 (-0,4, 0,4)	0,4	0,63
Hiperactividad	4,1 (3,8, 4,4)	3,7 (3,2, 4,1)	3,8 (3,3, 4,3)	3,8 (3,3, 4,3)	-0,3 (-0,9, 0,3)	0,4	0,29
Ansiedad	2,5 (2,0, 2,9)	2,1 (1,5, 2,7)	2,3 (1,7, 2,9)	2,0 (1,4, 2,5)	-0,1 (-0,5, 0,3)	0,4	0,52
Sensibilidad Sensorial	1,6 (1,4, 1,9)	1,2 (1,0, 1,5)	1,4 (1,2, 1,7)	1,4 (1,0, 1,8)	-0,3 (-0,6, 0,0)	0,4	0,15
Interés restringido	2,3 (1,9, 2,8)	2,6 (2,3, 3,0)	2,0 (1,6, 2,3)	2,0 (1,7, 2,4)	-0,2 (-0,6, 0,2)	0,4	0,87
Comportamiento autista	4,4 (4,0, 4,8)	4,6 (4,2, 5,0)	4,0 (3,5, 4,5)	4,4 (2,9, 5,0)	-0,2 (-0,6, 0,2)	0,4	0,37
Cuestionarios de síntomas de autismo (puntuación bruta); puntuaciones más bajas = menos síntomas de autismo							
Social	3,5 (3,1, 3,9)	3,6 (3,3, 3,9)	3,3 (2,8, 3,8)	3,4 (3,0, 3,8)	-0,1 (0,0, -0,2)	0,11	0,10
Comunicación	4,7 (4,4, 5,0)	4,6 (4,3, 4,8)	4,7 (4,5, 4,9)	4,7 (4,5, 4,9)	0,0 (-0,1, 0,1)	0,09	0,51
Comportamiento estereotipado	3,1 (2,8, 3,4)	3,4 (3,1, 3,8)	3,2 (2,8, 3,6)	3,6 (3,3, 3,9)	-0,2 (-0,1, -0,3)	0,12	0,02
Puntaje total	11,3 (10,6, 12,0)	11,6 (11,1, 12,1)	11,2 (10,5, 11,9)	11,7 (11,1, 12,3)	-0,3 (-0,1, -0,5)	0,04	0,02
Escala de respuesta social (puntuaciones T); puntuaciones más bajas = menos síntomas sociales							
Conciencia	79,2 (74,8, 83,7)	76,9 (72,6, 81,3)	78,7 (74,9, 82,4)	75,0 (69,6, 80,4)	0,3 (1,9, -1,3)	7,1	0,52
Cognición	83,7 (80,5, 87,0)	82,1 (78,7, 85,6)	79,3 (76,5, 82,2)	80,0 (76,3, 83,7)	0,8 (-0,6, 2,2)	5,8	0,37
Comunicación	82,5 (78,2, 86,8)	84,3 (81,1, 87,6)	80,1 (75,9, 84,4)	77,7 (72,7, 82,7)	1,5 (-0,1, 3,1)	4,2	0,11
Motivación	75,5 (70,4, 80,6)	78,9 (74,9, 82,6)	70,3 (65,8, 74,9)	73,0 (68,5, 77,6)	0,2 (-0,8, 1,2)	5,7	0,52
Manierismos	83,4 (79,6, 87,2)	84,2 (80,8, 87,7)	80,5 (76,1, 85,0)	79,8 (75,9, 83,8)	0,9 (-0,9, 2,7)	5,5	0,29
Total	84,9 (81,7, 88,1)	85,8 (83,0, 88,6)	82,2 (79,0, 85,4)	80,7 (76,9, 84,6)	0,8 (-0,8, 2,4)		0,29
Medida del impacto del autismo (puntuaciones brutas); puntuaciones más bajas = menor impacto del autismo en la familia							
Frecuencia	135 (126, 144)	143 (137, 149)	114 (105, 123)	125 (113, 136)	-2,2 (0,8, -5,2)		0,16
Impacto	105 (94, 116)	123 (111, 136)	87 (76, 99)	103 (89, 118)	3,4 (7,0, -0,2)		0,11
Sistema de Evaluación del Comportamiento para Niños (T-Scores). Los puntajes de problemas más bajos y los puntajes de habilidades más altas son mejores							
Problemas de externalización	60,9 (57,6, 64,2)	53,4 (49,8, 56,9)	57,7 (54,8, 60,6)	51,6 (48,1, 55,1)	-0,1 (-0,9, 0,7)	3,7	0,52
Problemas de internalización	49,3 (45,1, 53,5)	48,6 (43,4, 53,7)	43,1 (40,0, 46,2)	45,5 (41,5, 49,4)	-1,1 (-0,2, -2,0)	0,1	0,05
Problemas de comportamiento	71,1 (68,1, 74,1)	66,0 (62,5, 69,6)	65,3 (62,3, 68,2)	61,2 (57,3, 65,0)	(-0,9, 1,1)	3,7	0,63
Habilidades adaptativas	24,5 (22,0, 27,0)	25,0 (22,2, 27,7)	27,8 (25,3, 30,4)	26,1 (22,4, 29,7)	0,4 (0,0, 0,8)	3,8	0,87

«Adherencia al diligenciamiento de cuestionarios: ácido fólico 50/60 (83%), placebo 64/73 (88%). Intervalo de confianza con intervalo de confianza del 95%. Efectos estadísticamente significativos (PAGS<0.05) están en negrita. El efecto estimado es la diferencia en las medidas de resultado entre el grupo de ácido fólico y el de placebo según lo estimado por la regresión de modelo mixto. La diferencia mínima clínicamente importante (MCID) se calculó para cada índice utilizando el método de error estándar de medición. Para el cálculo se utilizaron la fiabilidad y las desviaciones estándar de las muestras autistas. El MCID se define como el cambio más pequeño en el resultado que un paciente identificaría como importante.»^{mi}PAGS-valores ajustados utilizando la tasa de descubrimiento falso.

Tabla 4. Incidencia de eventos adversos por grupo de tratamiento

Acontecimiento adverso, norte (%)	ácido fólico grupo (n=21) ^a	Placebo grupo (n=25)	General (n=46) ^a	PescadorPAGS
Emoción o agitación	6 (29%)	10 (40%)	16 (35%)	0,53
Insomnio	6 (29%)	10 (40%)	16 (35%)	0,53
Motricidad aumentada actividad	6 (29%)	9 (36%)	15 (33%)	0,75
Inquietud	3 (14%)	7 (28%)	10 (22%)	0,31
Agresión	2 (10%)	6 (24%)	8 (17%)	0,26
Aumento de las rabietas	15%	6 (24%)	7 (15%)	0,11
Involuntario movimientos	2 (10%)	4 (16%)	6 (13%)	0,67
Boca seca, excesiva sed	3 (14%)	1 (4%)	4 (9%)	0,32
Disminución del apetito	2 (10%)	2 (8%)	4 (9%)	1,00
Depresión	15%	3 (12%)	4 (9%)	0,61
Gastroesofágico reflujo	15%	3 (12%)	4 (9%)	0,61
Labilidad emocional	15%	3 (12%)	4 (9%)	0,61
Estreñimiento	2 (10%)	1 (4%)	3 (7%)	0,59
Congestión nasal	0 (0%)	3 (12%)	3 (7%)	0,24
Confusión	15%	1 (4%)	2 (4%)	1,00
Rigidez	15%	1 (4%)	2 (4%)	1,00
Diarrea	15%	1 (4%)	2 (4%)	1,00
Aumento de peso	2 (10%)	0 (0%)	2 (4%)	0,20
Dolor de cabeza	2 (10%)	0 (0%)	2 (4%)	0,20
Pérdida de peso	15%	0 (0%)	1 (2%)	0,46
Somnolencia	0 (0%)	1 (4%)	1 (2%)	1,00
Transpiración	0 (0%)	1 (4%)	1 (2%)	1,00
motora disminuida actividad	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,00
Temblores	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,00
Visión borrosa	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,00
Aumento de la salivación	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,00
Náuseas vómitos	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,00
Mareo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,00
Sarpullido	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1,00
Cualquier efecto adverso	12 (57%)	17 (68%)	29 (63%)	0,55

^aDos participantes en el grupo de ácido fólico no aceptaron la intervención, por lo que nunca tuvieron la oportunidad de informar efectos adversos y no se incluyeron en los cálculos de frecuencia de efectos adversos.

(22 ítems, cambio significativo 4,2), Motivación social (11 ítems, cambio significativo 5,7), Manierismos autistas (12 ítems, cambio significativo 5,5) y total (65 ítems). Cada elemento se califica de 0 a 3, donde las puntuaciones más altas indican una mayor gravedad. Las puntuaciones T estandarizadas (media 50, desviación estándar 10) oscilan entre 30 y 90.

El AIM, una medida de 45 ítems informada por los padres sobre la frecuencia y el impacto de los síntomas centrales del TEA durante las últimas 2 semanas utilizando dos escalas de 5 puntos de gravedad creciente que van del 1 al 5.⁵¹ Las puntuaciones de Frecuencia e Impacto oscilan entre 45 y 225.

El ASQ, una lista de verificación de 34 ítems (The Center for Autism and Related Disorders) que evalúa la interacción social (12 ítems, rango 0-4), comportamiento estereotipado (7 ítems, rango 0-4), síntomas de comunicación (15 ítems, rango 0-5) y síntomas totales (34 ítems, rango 0-13).⁵² Los estudios de TEA de intervención sugieren un cambio de 1,1 puntos como clínicamente significativo.⁵²

Biomarcadores. Se investigaron dos biomarcadores relacionados con el folato. Se analizaron los títulos de FRAA, tanto de bloqueo como de unión.²⁴ Se determinó la relación redox de glutatión reducido a oxidado libre de plasma.⁴⁸ Se midieron las vitaminas y minerales relacionados con el folato. Folato sérico total y vitamina B12 se midieron usando el kit de radioensayo MP Diagnostics SimulTRAC-SNB (Cat# 06B264806). Doctor's Data analizó zinc en plasma, cobre en sangre entera y magnesio en glóbulos rojos.

Establecimiento y mantenimiento de la fidelidad de la evaluación

El personal de investigación fue capacitado por un equipo de múltiples especialidades que constaba de dos psicólogos autorizados y un terapeuta del habla antes de realizar las evaluaciones. Durante el ensayo, un psicólogo de investigación supervisó al personal de investigación y brindó retroalimentación y reentrenamiento si fue necesario.

Monitoreo de efectos adversos

Los eventos adversos se monitorearon cada 3 semanas utilizando una modificación de la Escala de síntomas emergentes del tratamiento con registro de dosis. Los eventos adversos se consideraron relacionados con el tratamiento si comenzaron o empeoraron después del inicio del ensayo. Si los eventos adversos eran persistentes o graves, se ofreció a los padres la opción de reducir la dosis a la mitad o interrumpir la intervención. La dosis solo se podía reducir una vez y nunca se aumentaba si se reducía.

análisis estadístico

Se utilizó un análisis por intención de tratar.⁵³ Los análisis utilizaron la versión 9.3 de SAS. Para tener en cuenta los datos faltantes, se realizó una imputación múltiple.^{53,54} Se utilizó una imputación de 20.^{55,56} y se utilizó un análisis de sensibilidad para verificar el sesgo sistemático.⁵⁷

Modelos de regresión de efectos mixtos⁵⁸ se utilizaron para estimar el efecto y el tamaño del efecto del tratamiento. Los modelos incluyeron el efecto del tiempo y una intercepción aleatoria para dar cuenta del nivel de síntomas de cada individuo. Los modelos probaron la hipótesis de que el cambio en la medida de resultado fue mayor para el grupo de ácido fólico en comparación con el grupo de placebo. Esta interacción se probó específicamente usando un modelo de dos colas. t-prueba con un PAGSo0.05. Desde nuestro estudio anterior²⁴ demostró un gran tamaño del efecto, este estudio fue potenciado con un gran tamaño del efecto (Cohen's re =0,80), lo que proporcionó una potencia del 77% con 24 participantes por grupo.

Los análisis se realizaron en subgrupos definidos por biomarcadores de metabolismo anormal del folato. Los FRAA se dicotomizaron como positivos y negativos y la relación redox de glutatión se dicotomizó en relativamente alta (más normal, por encima de la mediana de 8,30) y baja (más anormal, por debajo de la mediana de 8,30). Se realizaron regresiones de modelo mixto, similares a las descritas anteriormente, en cada subgrupo por separado, ya que el estudio no tenía la potencia necesaria para investigar la interacción con estos biomarcadores mediante el modelo mixto.

Se realizó un análisis de los respondedores mediante la eliminación hacia atrás (PAGS<0,05 para permanecer en el modelo) regresión logística. La respuesta se definió por un aumento de cinco puntos estandarizados en la comunicación verbal, ya que esto define un cambio clínicamente significativo. La edad, el lenguaje de referencia y el desarrollo general de referencia (según lo indexado por la puntuación estandarizada compuesta de comportamiento de VABS) se ingresaron como posibles covariables. Para investigar si los biomarcadores del metabolismo anormal del folato estaban relacionados con la respuesta de los participantes, se realizaron regresiones logísticas con una interacción entre el grupo de tratamiento y cada biomarcador.

Las medidas de resultado secundarias se analizaron utilizando la regresión de modelo mixto. Debido a la gran cantidad de resultados secundarios, la corrección para comparaciones múltiples se realizó utilizando la tasa de descubrimiento falso.⁵⁹

evaluación de la comunicación verbal. En los estudios de validación, un cambio de 0,5 puntos se consideró clínicamente significativo.⁴³

La VABS es una medida confiable y válida de la capacidad para realizar habilidades cotidianas apropiadas para la edad a través de una entrevista estructurada de 20 a 30 minutos con un cuidador.⁴⁷ Se analizaron las puntuaciones estándar de la comunicación, la vida diaria, las habilidades sociales y motoras y el compuesto de comportamiento adaptativo. Las puntuaciones estándar tienen una media de 100, una desviación estándar de 15 y un rango de 20 a 160. Los estudios de intervención en TEA han demostrado que un cambio de 6 puntos es clínicamente significativo.⁴⁸

El ABC es un cuestionario de 58 ítems⁴⁷ que mide conductas disruptivas, incluida la Irritabilidad (15 ítems, rango 0-45); Retiro social (16 ítems, rango 0-48); estereotipia (7 ítems, rango 0-21); Hiperactividad (16 ítems, rango 0-48) y Habla Inapropiada (4 ítems, rango 0-12). Cada elemento se califica de 0 a 3, donde las puntuaciones más altas indican una mayor gravedad. Múltiples ensayos clínicos de TEA lo han utilizado y tiene validez convergente y divergente.⁴⁹ Los estudios intervencionistas de TEA sugieren que una disminución de 12 puntos en la puntuación total es clínicamente significativa.⁴⁵

El BASC va de 185 a 306 ítems y se valida en ASD.⁵⁰ Cada elemento se califica de 0 a 3, donde las puntuaciones más altas indican una mayor gravedad. Las puntuaciones T estandarizadas (media 50, desviación estándar 10) oscilan entre 20 y 120 para los síntomas de externalización, internalización y conductuales y entre 10 y 90 para las habilidades de adaptación.

El SRS es un cuestionario de 65 ítems que mide las habilidades sociales en cinco dominios: Conciencia social (8 ítems, cambio significativo 7.1), Cognición social (12 ítems, cambio significativo 5.8), Comunicación social

El número total de pacientes que informaron cada evento adverso se comparó entre los grupos de tratamiento mediante una prueba exacta de Fisher. Se analizaron los eventos adversos que posiblemente, probablemente o definitivamente estaban relacionados con los tratamientos.

RESULTADOS

Participantes

Ciento cincuenta y seis participantes fueron preseleccionados, y se encontró que 59 cumplían potencialmente con los criterios de inclusión/exclusión (Figura 1), de los cuales 11 no pasaron la prueba, 10 debido a que no tenían problemas de lenguaje y 1 a causa de un problema auditivo congénito. Veinticinco participantes fueron asignados al azar para recibir placebo y 23 fueron asignados al azar para recibir ácido fólico en dosis altas (rango de edad de 3 años 4 meses a 13 años 4 meses).

Las características de los participantes fueron similares en todos los grupos de tratamiento, excepto en el caso de las multivitaminas (Tabla 1). Las medidas de resultado iniciales no fueron significativamente diferentes entre los grupos de tratamiento, excepto por la comunicación verbal en los participantes negativos para FRAA ($F(1,14) = 4,58, P < 0,05$; tablas 2A y 2B). Todos los participantes evaluados por un calificador confiable de investigación independientemente excedieron el umbral de diagnóstico para ASD. El número medio de dosis olvidadas por semana no fue significativamente diferente entre los grupos. La adherencia fue 490% para los que devolvieron los frascos (20/25 placebo; 16/21 ácido fólico).

Resultado primario

La mejora en la comunicación verbal fue significativamente mayor para los participantes que recibieron ácido fólico en comparación con los participantes que recibieron placebo con un tamaño del efecto de mediano a grande (Cohen's $d = 0,70$) (Tabla 2A).

Se realizaron análisis separados para cada biomarcador del metabolismo del folato (Tabla 2A). En general, la mejora en la comunicación verbal fue significativamente mayor en los participantes que recibieron ácido fólico en comparación con los que recibieron placebo para los participantes con metabolismo anormal del folato (es decir, FRAA positivo, bajo índice redox de glutatión). Para los participantes con biomarcadores que indicaban un metabolismo del folato más normal (es decir, FRAA negativo, alto índice redox de glutatión), la mejora en la comunicación verbal no fue significativamente diferente entre los grupos.

También se realizó un análisis de respondedores. En general, hubo significativamente más respondedores en el grupo de ácido fólico en comparación con los que recibieron placebo ($\chi^2(1) = 8,92, P < 0,003$; Tabla 2B). Los FRAA predijeron la respuesta al ácido fólico ($\chi^2(1) = 4,92, P < 0,03$). Para ambos análisis, una mayor puntuación compuesta de comportamiento adaptativo inicial aumentó la probabilidad de respuesta ($\chi^2(1) = 6,92, P < 0,009$ y $\chi^2(1) = 7,74, P < 0,005$, respectivamente), pero todas las demás posibles covariables se eliminaron mediante eliminación hacia atrás. El estado redox del glutatión no se asoció significativamente con la respuesta al tratamiento.

Resultados secundarios

La Tabla 3 describe los resultados secundarios, incluida la diferencia mínima clínicamente importante. Las habilidades de la vida diaria en la VABS mejoraron significativamente en el grupo de ácido fólico en comparación con el grupo de placebo.

La adherencia a los cuestionarios de los padres no fue significativamente diferente entre los grupos de tratamiento. La irritabilidad, el letargo, el comportamiento estereotipado, la hiperactividad, el habla inapropiada y la puntuación total en el ABC mejoraron significativamente en el grupo de ácido fólico en comparación con el grupo de placebo. El comportamiento estereotípico y la puntuación total mejoraron significativamente en el grupo de ácido fólico en comparación con el grupo de placebo en el ASQ. Los problemas de internalización mejoraron significativamente para el grupo de ácido fólico en comparación con el grupo de placebo en el BASC.

No se analizaron los cuestionarios de los docentes ya que la adherencia fue inferior al 35%.

Eventos adversos

No hubo eventos adversos graves en el grupo de ácido fólico. Se abrió el cegamiento de un niño con placebo y se lo retiró del estudio debido a un posible evento adverso grave. Tres participantes de placebo se sometieron a una reducción de la dosis. No hubo diferencias significativas de grupo entre las frecuencias de eventos adversos (Tabla 4).

DISCUSIÓN

Este estudio encontró una mejora en un síntoma central importante del TEA, la comunicación verbal, en niños con TEA no sindrómicos que recibieron dosis altas de ácido fólico en comparación con el placebo, particularmente en aquellos participantes que dieron positivo para FRAA. También se observó una mejora en una serie de resultados secundarios, sin eventos adversos significativos. El efecto del ácido fólico es consistente con el efecto terapéutico de las intervenciones conductuales tempranas.^{39,40}

El ácido fólico puede tener efectos positivos en el metabolismo a través de múltiples vías (Figura complementaria S1). Primero, el ácido fólico puede normalizar el metabolismo de un carbono dependiente del folato.⁶⁰ En segundo lugar, a diferencia del ácido fólico, la forma sintética oxidada común de folato, el ácido fólico puede entrar fácilmente en el ciclo del folato sin ser reducido por la dihidrofolato reductasa.⁷ En tercer lugar, el ácido fólico puede atravesar la barrera hematoencefálica utilizando el transportador de folato reducido cuando el FRA está bloqueado por los FRAA o no es funcional debido a una disfunción mitocondrial o mutaciones genéticas.^{24,27}

Este estudio sugiere que los FRAA predicen la respuesta al tratamiento con dosis altas de ácido fólico. Esto es consistente con la noción de que los niños con ASD y FRAA pueden representar un subgrupo distinto.⁶¹ Otros factores, como los polimorfismos genéticos en los genes relacionados con el folato o la disfunción mitocondrial, pueden ser importantes para determinar la respuesta al tratamiento, pero no se examinaron en este estudio. Cuando la metilcobalamina se combinó con ácido fólico, se encontró una mejora en la comunicación y en el estado redox del glutatión.⁴⁸ De hecho, se necesitarán estudios futuros para definir los factores que predicen la respuesta al tratamiento, investigar la dosificación óptima y ayudar a comprender si otros compuestos podrían funcionar sinérgicamente con el ácido fólico.

Este estudio tuvo limitaciones. En primer lugar, el pequeño tamaño de la muestra puede haber dado lugar a un desequilibrio en las puntuaciones iniciales de lenguaje para un subgrupo y limitó la sensibilidad de los análisis para detectar algunos efectos del tratamiento. En segundo lugar, el diseño de sitio único solo proporciona una generalización limitada de estos resultados. En tercer lugar, aunque no se identificaron eventos adversos, la seguridad de este tratamiento requiere más estudio ya que muchos estudios de folato utilizan dosis más bajas y una población sana. En cuarto lugar, se necesitarán más estudios para determinar la dosis óptima de ácido fólico. La biodisponibilidad oral de folato está fuertemente influenciada por el microbioma entérico⁶²; pero existe una fuerte evidencia de que el microbioma entérico está alterado en niños con TEA.⁶³

Solo dos medicamentos han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos para el tratamiento del TEA, ambos medicamentos antipsicóticos indicados para síntomas asociados, no centrales, del TEA. Dentro de las 12 semanas, estos medicamentos pueden afectar negativamente el metabolismo de los lípidos, el colesterol y la glucosa y dar como resultado un marcado aumento de peso corporal.⁶⁴ y puede aumentar el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2.^{sesenta y cinco} Por lo tanto, se necesitan con urgencia medicamentos bien tolerados que se dirijan a los procesos fisiopatológicos y los síntomas centrales asociados con los TEA.

El ácido fólico se encuentra entre otros tratamientos descritos recientemente que se enfocan en las anomalías metabólicas y los síntomas centrales asociados con los TEA.^{45,47,48,66-70} Este estudio también respalda la idea de que la medición de FRAA antes de una prueba con ácido fólico puede ser útil para predecir la respuesta. En nuestro estudio anterior, ofrecimos tratamiento con ácido fólico a pacientes positivos para FRAA sin medir la concentración de folato en LCR.²⁴ Seguimos creyendo que esta es una alternativa razonable a una punción lumbar diagnóstica, pero debe ir acompañada de un seguimiento estrecho con un

médico experimentado. Dado que el TEA es probablemente un trastorno de por vida, el efecto adverso a largo plazo de cualquier tratamiento es motivo de preocupación. Dado que el ácido fólico puede usarse cada vez más para tratar los TEA en el futuro, los efectos adversos a corto y largo plazo deben estudiarse con más detalle para garantizar la seguridad.

CONCLUSIONES

En este pequeño ensayo de niños con TEA no síndrómico y deterioro del lenguaje, el tratamiento con dosis altas de ácido fólico durante 12 semanas dio como resultado una mejora en las medidas de comunicación verbal en comparación con el placebo. Estos hallazgos deben considerarse preliminares hasta que el tratamiento se evalúe en estudios multicéntricos más amplios y de mayor duración.

CONFLICTO DE INTERESES

EVQ y JMS son inventores de una patente para la detección de los autoanticuerpos descritos en este estudio (patente estadounidense 7.846.672 B2) otorgada a la Fundación de Investigación de la Universidad Estatal de Nueva York. REF y EVQ son miembros del Consejo Asesor Científico de Iliad Neurosciences, Inc. Los demás autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

EXPRESIONES DE GRATITUD

Esta investigación fue financiada, en parte, por Lee Silsby Compounding Pharmacy (a REF), Autism Speaks (#8202 a EVQ), Brenen Hornstein Autism Research and Education Foundation (a REF), Fraternal Order of Eagles (a REF), Autism Research Institute (a REF) y la Fundación Jane Botsford Johnson (a SJJ). Este ensayo está registrado en Clinicaltrials.gov como NCT01602016.

DESCARGO DE RESPONSABILIDAD

Ninguno de los patrocinadores participó en el diseño o la realización del estudio, la recopilación, la gestión, el análisis o la interpretación de los datos; o preparación, revisión, aprobación del manuscrito o decisión de enviar el manuscrito para su publicación. REF, JS y LD tuvieron pleno acceso a todos los datos del estudio y asumieron la responsabilidad de la integridad de los datos y la precisión del análisis de datos. Este estudio no ha sido publicado previamente.

REFERENCIAS

- Zablotsky B, Black LI, Maenner MJ, Schieve LA, Blumberg SJ. Prevalencia estimada de autismo y otras discapacidades del desarrollo luego de cambios en el cuestionario de la Encuesta Nacional de Entrevistas de Salud de 2014. *Representante de estadísticas de salud nacional* 2015; 1-20.
- Rossignol DA, Frye RE. Una revisión de las tendencias de investigación en anomalías fisiológicas en los trastornos del espectro autista: desregulación inmunitaria, inflamación, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y exposición a sustancias tóxicas ambientales. *Mol psiquiatría* 2012;17:389-401.
- Rossignol DA, Frye RE. Evidencia que vincula el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la inflamación en el cerebro de las personas con autismo. *Fisiol frontal* 2014; 5: 150.
- Frye RE, Rossignol DA. Identificación y tratamiento de enfermedades fisiopatológicas comorbilidades del trastorno del espectro autista para lograr resultados óptimos. *Clin Med Insights Pediatr* 2016;10:43-56.
- Frye RE, Rossignol DA. Tratamientos para anomalías biomédicas asociadas con desorden del espectro autista. *Pediatría frontal* 2014;2:66.
- Vahabzadeh A, McDougle CJ. Riesgo y suplementos de ácido fólico materno de autismo. *JAMA* 2013;309:2208.
- Frye RE, James SJ. Patología metabólica del autismo en relación con el metabolismo redox. *Biomark Med* 2014;8:321-330.
- Suren P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz Det al. Asociación entre el uso materno de suplementos de ácido fólico y el riesgo de trastornos del espectro autista en los niños. *JAMA* 2013;309:570-577.
- Steenweg-de Graaff J, Ghassabian A, Jaddoe VW, Tiemeier H, Roza SJ. folato concentraciones durante el embarazo y rasgos autistas en la descendencia. El estudio de la Generación R. *Eur J Public Health* 2015;25:431-433.
- Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee Het al. Materno ingesta periconcepcional de ácido fólico y riesgo de trastornos del espectro autista y retraso en el desarrollo en el estudio de casos y controles CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment). *Soy J Clin Nutr* 2012;96:80-89.
- Ramaekers VT, Rothenberg SP, Sequeira JM, Opladen T, Blau N, Quadros EV et al. Autoanticuerpos contra los receptores de folato en el síndrome de deficiencia de folato cerebral. *N Inglés J Med* 2005;352:1985-1991.
- Ramaekers VT, Hausler M, Opladen T, Heimann G, Blau N. Psychomotor retardación, paraplejía espástica, ataxia cerebelosa y discinesia asociadas con niveles bajos de 5-metiltehidrofolato en el líquido cefalorraquídeo: una nueva afección neurometabólica que responde a la sustitución del ácido fólico. *neuropediatría* 2002;33:301-308. 13 Moretti P, Peters SU, Del Gaudio D, Sahoo T, Hyland K, Bottiglieri T et al. Reporte breve: síntomas autistas, regresión del desarrollo, retraso mental, epilepsia y discinesias en la deficiencia de folato del SNC. *J Autismo Dev Trastorno* 2008;38:1170-1177. 14 Moretti P, Sahoo T, Hyland K, Bottiglieri T, Peters S, del Gaudio Det al. Cerebral Deficiencia de folato con retraso en el desarrollo, autismo y respuesta al ácido fólico. *Neurología* 2005;64:1088-1090.
- Ramaekers VT, Blau N, Sequeira JM, Nassogne MC, Quadros EV. receptor de folato autoinmunidad y deficiencia de folato cerebral en el autismo de bajo funcionamiento con déficits neurológicos. *neuropediatría* 2007;38:276-281.
- Ramaekers VT, Hansen SI, Holm J, Opladen T, Senderek J, Hausler Met al. Reducción del transporte de folato al SNC en pacientes de sexo femenino con Rett. *Neurología* 2003; 61: 506-515.
- Ramaekers VT, Sequeira JM, Artuch R, Blau N, Temudo T, Ormazabal A et al. folato autoanticuerpos del receptor y deficiencia de 5-metiltehidrofolato en el líquido cefalorraquídeo en el síndrome de Rett. *neuropediatría* 2007;38:179-183.
- Pérez-Dueñas B, Ormazabal A, Toma C, Torrico B, Cormand B, Serrano Met al. Síndromes de deficiencia de folato cerebral en la infancia: aspectos clínicos, analíticos y etiológicos. *Archivo Neurol* 2011;68:615-621.
- Fry RE. Trastornos metabólicos y mitocondriales asociados con la epilepsia en niños con trastorno del espectro autista. *Comportamiento de la epilepsia* 2015;47:147-157.
- García-Cazorla A, Quadros EV, Nascimento A, García-Silva MT, Briones P, Montoya J et al. Enfermedades mitocondriales asociadas con la deficiencia de folato cerebral. *Neurología* 2008;70:1360-1362.
- Hasselmann O, Blau N, Ramaekers VT, Quadros EV, Sequeira JM, Weissert M. Deficiencia de folato cerebral y marcadores inflamatorios del SNC en la enfermedad de Alpers. *Mol Genet Metab* 2010;99:58-61.
- Serrano M, García-Silva MT, Martín-Hernández E, O'Callaghan Mdel M, Quijada P, Martínez-Aragón A et al. Síndrome de Kearns-Sayre: deficiencia de folato cerebral, hallazgos de resonancia magnética y nuevas características bioquímicas del líquido cefalorraquídeo. *mitocondria* 2010; 10:429-432.
- Grapp M, Just IA, Linnankivi T, Wolf P, Lucke T, Hausler Met al. Molecular la caracterización de las mutaciones del receptor de folato 1 delinea la deficiencia de transporte de folato cerebral. *Cerebro* 2012;135(Parte 7): 2022-2031.
- Frye RE, Sequeira JM, Quadros EV, James SJ, Rossignol DA. folato cerebral autoanticuerpos del receptor en el trastorno del espectro autista. *Mol psiquiatría* 2013;18: 369-381.
- Ramaekers VT, Sequeira JM, Blau N, Quadros EV. Una dieta sin leche regula a la baja autoinmunidad del receptor de folato en el síndrome de deficiencia de folato cerebral. *Dev Med Child Neurol* 2008;50:346-352.
- Sequeira JM, Ramaekers VT, Quadros EV. La utilidad diagnóstica del receptor de folato autoanticuerpos en sangre. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:545-554.
- Desai A, Sequeira JM, Quadros EV. La base metabólica del desarrollo. Trastornos por transporte defectuoso de folato. *bioquímica* 2016;126:31-42.
- Ramaekers VT, Quadros EV, Sequeira JM. Papel de los autoanticuerpos del receptor de folato en autismo infantil. *Mol psiquiatría* 2013;18:270-271.
- Sequeira JM, Desai A, Berrocal-Zaragoza MI, Murphy MM, Fernandez-Ballart JD, Quadros EV. La exposición a los anticuerpos alfa del receptor de folato durante la gestación y el destete conduce a graves déficits de comportamiento en ratas: un estudio piloto. *Más uno* 2016; 11: e0152249.
- Shoffner J, Trommer B, Thurm A, Farmer C, Langley WA III, Soskey Let al. Concentraciones de LCR de 5-metiltehidrofolato en una cohorte de niños pequeños con autismo. *Neurología* 2016;86:2258-2263.
- Tilford JM, Payakachat N, Kovacs E, Pyne JM, Brouwer W, Nick T Get al. Preferencia- resultados de calidad de vida relacionados con la salud en niños con trastornos del espectro autista: una comparación de instrumentos genéricos. *Farmacoeconomía* 2012;30: 661-679.
- Mukaddes NM, Tutkunkardas MD, Sari O, Aydin A, Kozanoglu P. Características de niños que perdieron el diagnóstico de autismo: una muestra de Estambul, Turquía. *Autismo Res Tratar* 2014;2014:472120.
- Tager-Flusberg H, Rogers S, Cooper J, Landa R, Lord C, Paul Ret al. Definición Puntos de referencia del lenguaje hablado y selección de medidas de desarrollo del lenguaje expresivo para niños pequeños con trastornos del espectro autista. *J Voz Idioma Oír Res* 2009;52:643-652.
- Luyster R, Qiu S, Lopez K, Lord C. Predicción de resultados de niños referidos para autismo utilizando el Inventario de Desarrollo Comunicativo MacArthur-Bates. *J Voz Idioma Oír Res* 2007;50:667-681.

- 35 Condouris K, Meyer E, Tager-Flusberg H. La relación entre los estándares medidas de lenguaje y medidas de habla espontánea en niños con autismo. *Soy J Habla Lang Pathol*2003;12:349–358.
- 36 Edgar JC, Khan SY, Blaskey L, Chow VY, Rey M, Gaetz Wet al. neuromagnético Las oscilaciones predicen retrasos en la latencia de la respuesta evocada y déficits del lenguaje central en los trastornos del espectro autista. *J Autismo Dev Trastorno*2015;45:395–405.
- 37 Verly M, Verhoeven J, Zink I, Mantini D, Van Oudenhove L, Lagae Let al. Estructural y la subconectividad funcional como predictor negativo del lenguaje en el autismo. *Mapa cerebral Hum*2014;35:3602–3615.
- 38 Volden J, Smith IM, Szatmari P, Bryson S, Fombonne E, Mirenda Pet al. Uso de la escala de lenguaje preescolar, cuarta edición para caracterizar el lenguaje en preescolares con trastornos del espectro autista. *Soy J Habla Lang Pathol*2011;20: 200–208.
- 39 Schreibman L, Stahmer AC. Una comparación de ensayos aleatorios de los efectos de verbal y estrategias pictóricas de comunicación naturalista sobre el lenguaje hablado para niños pequeños con autismo. *J Autismo Dev Trastorno*2014;44:1244–1251.
- 40 Wetherby AM, Guthrie W, Woods J, Schatschneider C, Holland RD, Morgan Let al. Intervención social implementada por los padres para niños pequeños con autismo: un ECA. *Pediatría*2014;134:1084–1093.
- 41 Mantequilla E, Mulick J. La Escala de Impresiones Clínicas del Autismo de Ohio (OACIS). Instituto RSE: Colón, OH, 2006.
- 42 Psicofarmacología TORUoP. Escala de calificación de autismo de la OSU. Unidad de Investigación de la OSU sobre Psicofarmacología pediátrica: Columbus, OH, 2005.
- 43 Choque Olsson N, Bolte S. Breve informe: Evaluación "rápida y (no tan) sucia" de cambio en el autismo: confiabilidad transcultural de las discapacidades del desarrollo CGAS y el autismo CGI de OSU. *J Autismo Dev Trastorno*2014;44:1773–1778.
- 44 Wink LK, Early M, Schaefer T, Pottenger A, Horn P, McDougle Cjet al. Masa corporal cambio de índice en los trastornos del espectro autista: comparación del tratamiento con risperidona y aripiprazol. *J Niño Adolescente Psicofármaco*2014;24:78–82. 45 Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahy JW, Talalay Pet al. sulforafano tratamiento del trastorno del espectro autista (TEA). *Proc Natl Acad Sci EE. UU.*2014;111: 15550–15555.
- 46 Arnold LE, Aman MG, Hollway J, Hurt E, Bates B, Li Xet al. Piloto controlado con placebo ensayo de mecamilamina para el tratamiento de los trastornos del espectro autista. *J Niño Adolescente Psicofármaco*2012;22:198–205.
- 47 Frye RE, DeLatorre R, Taylor HB, Slattey J, Melnyk S, Chowdhury Net al. Metabólico efectos del tratamiento con sapropterina en el trastorno del espectro autista: un estudio preliminar. *Psiquiatría Transl*2013;3:e237.
- 48 Frye RE, Melnyk S, Fuchs G, Reid T, Jernigan S, Pavliv Oet al. Efectividad de El tratamiento con metilcobalamina y ácido fólico sobre el comportamiento adaptativo en niños con trastorno autista está relacionado con el estado redox del glutatión. *Autismo Res Tratar*2013; 2013: 609705.
- 49 Kaat AJ, Lecavalier L, Aman MG. Validez de la lista de verificación de comportamiento aberrante en niños con trastorno del espectro autista. *J Autismo Dev Trastorno*2014;44: 1103–1116.
- 50 Turygin NC, Matson JL, Adams H, Belva B. El efecto de los criterios del DSM-5 en la Síntomas nalizantes, internalizantes, conductuales y adaptativos en niños diagnosticados con autismo. *Dev neurorrehabilitación*2013;dieciséis:277–282.
- 51 Kanne SM, Mazurek MO, Sikora D, Bellando J, Branum-Martin L, Handen Bet al. La Medida de Impacto del Autismo (AIM): desarrollo inicial de una nueva herramienta para la medición del resultado del tratamiento. *J Autismo Dev Trastorno*2014;44:168–179.
- 52 Frye RE, Tippett M, Delhey L, Slattey J. Test-retest fiabilidad y validez de la Cuestionario de síntomas de autismo. *N Am J Med Sci*2015;8:149–153.
- 53 Detry MA, Lewis RJ. El principio de intención de tratar: cómo evaluar el verdadero efecto de elegir un tratamiento médico. *JAMA*2014;312:85–86.
- 54 White IR, carpintero J, Horton NJ. Incluir a todos los individuos no es suficiente: lecciones para el análisis por intención de tratar. *Ensayos clínicos*2012;9:396–407.
- 55 yuanes YC. Imputación múltiple de datos faltantes: conceptos y nuevos desarrollos (Versión SAS 9.0). Instituto SAS Inc.: Rockville, MD, 2011.
- 56 Graham JW, Olchowski AE, Gilreath TD. ¿Cuántas imputaciones se necesitan realmente? Algunas aclaraciones prácticas de la teoría de imputación múltiple. *Ciencia anterior*2007; 8: 206–213.
- 57 Matts JP, Launer CA, Nelson ET, Miller C, Dain B. Una evaluación gráfica de la impacto potencial de las pérdidas durante el seguimiento sobre la validez de los resultados del estudio. Los Programas Comunitarios Terry Beirn para la Investigación Clínica sobre el SIDA. *Stat Med*1997;dieciséis: 1943–1954.
- 58 Laird NM, Ware JH. Modelos de efectos aleatorios para datos longitudinales. *Biometría*mil novecientos ochenta y dos; 38:963–974.
- 59 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a Practical and poderoso enfoque para pruebas múltiples. *J Roy Stat Soc Ser B*1995;57:289–300. 60 Boarman DM, Baram J, Allegra CJ. Mecanismo de leucovorina reversión de método citotoxicidad del trexato en células humanas de cáncer de mama MCF-7. *Bioquímica Farmacéutica* 1990; 40:2651–2660.
- 61 Frye RE, Delhey L, Slattey J, Tippett M, Wynne R, Rose Set al. Bloqueo y Los autoanticuerpos alfa del receptor de folato que se unen identifican nuevos subgrupos de trastornos del espectro autista. *Neurociencia frontal*2016;10:80.
- 62 Yatsunenok T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Domínguez-Bello MG, Contreras M et al. Microbioma intestinal humano visto a través de la edad y la geografía. *Naturaleza*2012; 486:222–227.
- 63 Frye RE, Slattey J, MacFabe DF, Allen-Vercoe E, Parker W, Rodakis Jet al. Enfoques para estudiar y manipular el microbioma entérico para mejorar los síntomas del autismo. *Microb Ecol Health Dis*2015;26:26878.
- 64 Correll CU, Manu P, Olshanskiy V, Napolitano B, Kane JM, Malhotra AK. Riesgo cardiometabólico de medicamentos antipsicóticos de segunda generación durante el primer uso en niños y adolescentes. *JAMA*2009;302:1765–1773.
- 65 Bobo WW, Cooper WO, Stein CM, Olfson M, Graham D, Daugherty Jet al. Los antipsicóticos y el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 en niños y jóvenes. *JAMA Psiquiatría*2013;70:1067–1075.
- 66 Klaiman C, Huffman L, Masaki L, Elliott GR. Tetrahidrobiopterina como tratamiento para trastornos del espectro autista: un ensayo doble ciego controlado con placebo. *J Niño Adolescente Psicofármaco*2013;23:320–328.
- 67 Lemonnier E, Degrez C, Phelep M, Tyzio R, Josse F, Grandgeorge Met al. Un ensayo controlado aleatorio de bumetanida en el tratamiento del autismo en niños. *Psiquiatría Transl*2012;2:e202.
- 68 Yui K, Sato A, Imataka G. Disfunción mitocondrial y su relación con Señalización mTOR y daño oxidativo en los trastornos del espectro autista. *Mini Rev Med Chem*2015;15:373–389.
- 69 Tang G, Gudsnuok K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov Aet al. Pérdida de La macroautofagia dependiente de mTOR causa déficits de poda sináptica de tipo autista. *Neurona*2014;83:1131–1143.
- 70 Naviaux JC, Schuchbauer MA, Li K, Wang L, Risbrough VB, Powell Sbet al. Inversión de comportamientos similares al autismo y metabolismo en ratones adultos con terapia antipurinérgica de dosis única. *Psiquiatría Transl*2014;4:400 e.



Este trabajo tiene una licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. Las imágenes o otros materiales de terceros en este artículo están incluidos en la licencia Creative Commons del artículo, a menos que se indique lo contrario en la línea de crédito; si el material no está incluido bajo la licencia Creative Commons, los usuarios deberán obtener el permiso del titular de la licencia para reproducir el material. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

© El autor(es) 2016

La información complementaria acompaña al documento en el sitio web de psiquiatría molecular (<http://www.nature.com/mp>)