



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Caracterización del estatus nutricional y de la
bacteriota de niños con diarrea aguda causada por
tres patotipos de *Escherichia coli* que requirieron
hospitalización”**

T E S I S

Que presenta:

Maria Fernanda Decaro Fragoso

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Biomedicina molecular

Directora de tesis:

Dra. María Teresa Estrada García

El presente trabajo se realizó en Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. María Teresa Estrada García.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mediante el CVU 1008733.

ASESORES:

DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

DR. JAIME GARCÍA MENA

INVESTIGADOR TITULAR 3C

DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

CINVESTAV-IPN

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, porque me han guiado a ser lo que soy ahora y a darme cuenta de que no hay límites para mí.

A mi familia, en especial a mis hermanos y hermanas, a mi abuelita Alfonsi y a mi pequeño sobrino, porque siempre han estado presentes en mi vida y en esta temporada difícil como lo fue una pandemia mundial nos sentimos más unidos que nunca.

A la Dra. María Teresa Estrada García, por aceptarme como su alumna, tenerme mucha paciencia y creer en mí a pesar de las circunstancias en las que se encontraba.

A Aby Cubillo, por acompañarme este último año y hacer todo más fácil.

A mis compañeros de laboratorio, por siempre darse tiempo para escucharme, en especial Adriana y David, por enseñarme lo que saben, tenerme paciencia y darme consejos para mejorar en esto que fue todo un reto para mí.

A mis amigos, por llenarme de consejos y porras, además de siempre hacer mi vida más divertida e interesante.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Desnutrición infantil.....	3
Generalidades de la microbiota	4
Bacteriota intestinal.....	5
La composición de la microbiota intestinal depende directamente de la dieta del hospedero.....	13
La microbiota y el estatus nutricional del niño	14
El síndrome diarreico.....	16
Desnutrición y diarrea “un círculo vicioso”	19
Epidemiología del síndrome de diarrea en infantes en el estado de Yucatán	20
<i>Escherichia coli</i>	21
<i>E. coli</i> de adherencia difusa	22
<i>E. coli</i> enteroagregativa	24
<i>E. coli</i> Enteropatógena	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
Objetivo general	29
Objetivos específicos.....	29
MATERIALES Y METODOS	30
Población de estudio	30
Determinación del estatus nutricional de los niños.....	30
Población de estudio para determinación de la bacteriota.....	31
Precipitación de DNA en fenol cloroformo	32
Prueba de amplificación del DNA	32
Construcción de las bibliotecas y la secuenciación del gen 16S rRNA.....	33
Análisis bioinformático.....	33
Análisis estadístico.....	34
Análisis de las rutas metabólicas.....	34

RESULTADOS.....	36
Incidencia de desnutrición en niños menores de 5 años con diarrea aguda causada por un solo patógeno.....	36
Características de la población de niños con diarrea causada por PEDs como patógenos únicos a los que se le caracterizó la bacteriota por la técnica del 16rRNA	38
Análisis comparativo de las abundancias relativas de los OTUs a diferentes niveles taxonómicos entre pacientes con DAEC con y sin desnutrición	39
Análisis comparativo de las abundancias relativas de los OTUs a diferentes niveles taxonómicos entre pacientes con EAEC con y sin desnutrición	41
Análisis comparativo de las abundancias relativas de los OTUs a diferentes niveles taxonómicos entre pacientes con EPECa con y sin desnutrición.....	43
Análisis de ausencia y presencia de OTUs en las muestras de niños con diarrea aguda por PEDs con y sin desnutrición.....	45
Comparación del índice de diversidad α de los OTUS identificados en los pacientes con PEDS con y sin desnutrición.	45
Comparación del índice de diversidad β de los OTUS identificados en los pacientes con PEDS con y sin desnutrición, por el índice de Bray-Curtis.....	46
Identificación en el bacterioma de los pacientes con y sin desnutrición de posibles biomarcadores bacterianos	48
El efecto de la composición de la bacteriota en el perfil metabólico de los pacientes con diarrea causada por DAEC con desnutrición vs. sin desnutrición..	49
El efecto de la composición de la bacteriota en el perfil metabólico de los pacientes con diarrea causada por EAEC con desnutrición vs. sin desnutrición..	50
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIÓN.....	64
PERSPECTIVAS.....	65
REFERENCIAS	66

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Distribución a lo largo del intestino de los principales grupos bacterianos..	9
Figura 2. Adquisición y composición de la microbiota, desde la gestación hasta la niñez.....	13
Figura 3. Tasa de mortalidad por enfermedades diarreicas, 2017.	18
Figura 4. Porcentaje de la población de 0 a 4 años que presento diarrea en las dos semanas previas a la entrevista, por sexo.....	18
Figura 5. Factores de riesgo que predisponen a una desnutrición y a padecer diarrea.....	19
Figura 6. Gráfica de patrones de crecimiento de la OMS en puntuación Z.....	31
Tabla 1. Estado nutricional de los niños menores de 5 años con diarrea aguda causada por un patógeno único.	36
Tabla 2. Estado nutricional de los niños menores de 5 años con diarrea aguda causada por un patógeno único.	37
Figura 7. Abundancia relativa de los OTUs identificados en las muestras con DAEC provenientes de niños con y sin desnutrición.....	40
Figura 8. Abundancia relativa de los OTUs identificados en las muestras con EAEC proveniente de niños con y sin desnutrición.....	42
Figura 9. Abundancia relativa de los OTUs identificados en las muestras con EPECa provenientes de niños con y sin desnutrición.....	44
Figura 10. Índices de diversidad α de las muestras de niños con DAEC, EAEC y EPECa con y sin desnutrición.....	45
Figura 11. Diversidad β de las muestras de los niños con DAEC, EAEC y EPECa con y sin desnutrición.....	48
Figura 12. Identificación de posibles biomarcadores bacterianos en las muestras de niños con DAEC, EAEC y EPECa y con desnutrición.	49
Figura 13. El gráfico de barra de error extendida muestra las funciones metabólicas putativas que se encuentran enriquecidas en las heces de los pacientes con DAEC, con y sin desnutrición, el cual se determinó mediante PICRUST2.	50
Figura 14. El gráfico de barra de error extendida muestra las funciones metabólicas putativas que se encuentran enriquecidas en las heces de los pacientes con EAEC, con y sin desnutrición, el cual se determinó mediante PICRUST2.	50
Figura 15. El gráfico de barra de error extendida muestra las funciones metabólicas putativas que se encuentran enriquecidas en las heces de los pacientes con EPECa, con y sin desnutrición, el cual se determinó mediante PICRUST2.....	52

RESUMEN

Introducción: La diarrea y la desnutrición continúan siendo unas de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños <5 años en México y en regiones menos desarrolladas del mundo. Además, la interacción entre estas dos condiciones resulta en un círculo vicioso que conduce no solo a las pérdidas de peso y talla, sino también en un deterioro cognoscitivo del infante. Los patotipos de *Escherichia coli* diarreogénicas (PED) se encuentran entre los principales agentes etiológicos de la diarrea en México y el mundo. La composición de la microbiota intestinal, tiene un papel muy importante en estas dos patologías, tanto cuando están juntas o separadas. En este trabajo, se caracterizó el estatus nutricional (desnutrición, aguda o crónica) de 214 niños con diarrea aguda, <5 años, del estado de Yucatán, que requirieron hospitalización. En su conjunto, los pacientes con diarrea por PEDs tuvieron una mayor incidencia de desnutrición comparado con los pacientes con diarrea causada por otros patógenos (58.8% vs. 41.2%, $p < 0.05$, OR 2.043). De los 45 niños con diarrea causada por *E. coli* enterodifusa (DAEC), 30 (66.6%) tuvieron desnutrición, 16 (50%) de los 32 niños con diarrea por *E. coli* enteroagregativa (EAEC), 13 (59.1%) de los 22 por *E. coli* enteropatógeno atípica (EPECa) y 5 (50%) de los 10 por *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). De las otras bacterias causantes de diarrea incluidos en el estudio, de los 40 casos de *Salmonella entérica*, 23 (57.5%) tenían desnutrición, siendo el patógeno más frecuentemente asociados con esta condición; seguido de *Shigella spp* con 19 (44.1%) de 43 pacientes y *Campylobacter spp* fue el que con el menor número de casos solo con 4 (18%) de los 22 pacientes. De tal manera que se observaron diferencias significativas en el número de niños con desnutrición y diarrea por DAEC vs. los niños con diarrea con *Shigella spp* (OR 3.47) y *Campylobacter spp* (OR 12.38), así como entre EAEC (OR 4.5) y EPECa (OR 6.5) vs. *Campylobacter spp*. Con el fin de caracterizar la bacteriota intestinal, 72 muestras de heces se seleccionaron con base en las características clínicas de los pacientes con DAEC (30), EAEC (25) y EPECa (17), así como se realizó la comparación de esta bacteriota entre niños con vs. sin desnutrición por patotipo. Con respecto a la diversidad α , abundancia y riqueza de los OTUs, no se observó diferencias significativas entre ninguna de las comparaciones. Sin embargo, la diversidad β , disimilitud entre los OTUs de los grupos, mostró diferencias significativas entre los patotipos, así como entre las condiciones de desnutrición vs. sin desnutrición. Los OTUs significativamente más abundantes en los niños con diarrea por patotipo y desnutrición fueron los siguientes: para DAEC las familias Prevotellaceae (Bacteroidetes) y Veillonellaceae (Firmicutes), así como el género *Prevotella 9* ($p < 0.05$) y para EAEC, la familia Veillonellaceae y el género *Veillonella* ($p < 0.05$), sin embargo, no se encontró ningún OTU asociado para el caso de EPECa. Los biomarcadores identificados entre la comparación de PEDs con desnutrición vs. sin desnutrición, por la técnica de LDA, identificó que los OTUs más prevalentes, pertenecieron al phylum Firmicutes: la clase Negativicutes, el orden Selenomonadales y la familia Veillonellaceae (LDA >4), estos dos últimos pertenecientes a la clase Negativicutes. Como se observa, la familia Veillonellaceae es el OTU comúnmente identificado en estos pacientes, en algunos géneros como *Veillonella* sus principales vías metabólicas involucran la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como acetato y propionato, los cuales pueden participar en la síntesis de glutamina y cuerpos cetónicos, así como en la gluconeogénesis e inhibir la síntesis de colesterol. También identificamos por PICRUST2 en estas bacterias, vías metabólicas enriquecidas, que en su conjunto contribuyen a la regulación de la homeostasis bacteriana y del hospedero, tales como a la síntesis de aminoácidos esenciales y no esenciales, la síntesis de vitaminas y vías relacionadas con la degradación de carbohidratos. Conclusiones: Los niños con desnutrición presentan dos veces más la probabilidad de presentar un episodio de diarrea por PEDs en comparación con las otras bacterias causantes de diarrea, particularmente la probabilidad de tener un episodio con DAEC es 12 veces mayor que con *Campylobacter spp*. Las bacterias de los niños con PEDs y desnutrición, están constituidas por OTUs que en su conjunto contienen vías metabólicas que podría contribuir al ajuste metabólico de estos niños, es decir en la adaptación al ambiente restringido de nutrientes, proporcionando fuentes de energía y aminoácidos.

ABSTRACT

Introduction: Diarrhoea and malnutrition continue to be mayor causes of morbidity and mortality in children under five years of age in Mexico and in less developed regions of the world. Furthermore, the interactions between these two conditions results in a vicious circle that leads not only to weight and size loss, but also to a cognoscitive infant impairment. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes (DEC) are among the main aetiological agents of diarrhoea in Mexico and worldwide. The gut microbiome composition of the host plays an important role in these two pathologies, in both when they are together and separate. In the present work, the nutritional status (acute and chronic malnutrition) of 214 children with acute diarrhoea, <5 years old, from Yucatán state, requiring hospitalisation was characterized. Altogether, PEDs patients with diarrhoea had the mayor incidence malnutrition in comparison with patients with diarrhoea caused by other pathogens (58.8% vs. 41.2%, $p < 0.05$, OR 2.043). Of the 45 with diarrhoea caused by diffusely adherent *E. coli* (DAEC), 30 (66.6%) were malnourished, 16 (50%) of the 32 children with diarrhoea due to enteroaggregative *E. coli* (EAEC), 13 (59.1%) of the 22 children with atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC), and 5 (50%) of the with enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). Of the other diarrheagenic bacteria included in the study, of the 40 *Salmonella entérica* cases, 23 (57.5%) were malnourished, of these group was the pathogen more frequently associated with malnutrition; followed by *Shigella spp.* with 19 (44.1%) of 43 patients and *Campylobacter spp.* was the group with lower cases of malnutrition with only 4 (18%) cases of the 22 patients. Therefore, significant difference were observed in the number of malnourished children with diarrhoea by DAEC vs. with children with diarrhoea by *Shigella spp.* (OR 3.47) and *Campylobacter spp.* (OR 12.38), likewise between EAEC (OR 4.5) and aEPEC (OR 6.5) vs. *Campylobacter spp.* Aiming to characterise the gut bacteriota, 72 faeces samples were selected based on their clinical characteristics of DAEC (30), EAEC (25) and EPECa (17), patients, for comparison between children's bacteriota malnourished vs. non-malnourished by pathotype. Among the comparisons non-significant differences were observed regarding OTUs α diversity, abundance, and richness. However, β diversity, OTUs dissimilitude between the groups, significant differences were observed between pathotypes, as between conditions, malnourished vs. non-malnourished. Among the children with diarrhea by DEC and malnutrition, the most significant abundant OTUs were: Prevotellaceae (Bacteroidetes) y Veillonellaceae (Firmicutes) las familias, and Prevotella 9 ($p < 0.05$) genus for DAEC and the Veillonellaceae family and *Veillonella* ($p < 0.05$) genus, for EAEC, however, OTUs were not significantly associated with EPECa. As observed, Veillonellaceae family was the OTU more commonly identified among malnourished patients, some genus as *Veillonella* their main metabolic pathways include short chain fatty acid synthesis (SCFA) as acetate and propionate, that can in turn participate in glutamine and ketonic bodies synthesis, gluconeogenesis and inhibit cholesterol synthesis as well. By PICRUST2 metabolic pathways among these bacteriotas were identified that together contribute to the bacterial and host homeostasis regulation, as essential and non-essential amino acids synthesis, vitamin synthesis and with pathways related to carbohydrate degradation. Conclusions: Malnourished children have two times more the possibility of presenting a diarrheal episode due to DEC's in comparison with other diarrheagenic bacterial, particularly the probability of having a diarrheal episode caused by DAEC is 12 times higher than with *Campylobacter spp.* Bacteriotas of children with PEDs and malnourished are constituted by OTUs that together contain metabolic pathways that may contribute to the children's metabolic adjustment, meaning adaptation to the limited nutrients environmental, providing energy and aminoamides sources.

INTRODUCCIÓN

El estado nutricional se define como el resultado del balance entre las necesidades nutrimentales, la ingesta de alimentos y el gasto calórico. Por otro lado, existen otros factores que influyen sobre el estado nutricional como: los sociales, los económicos y los ambientales. Estos factores pueden dar lugar a una ingesta insuficiente o excesiva de nutrientes. (Pedraza, 2004)

El bienestar nutricional, depende tanto del contenido nutrimental de los alimentos que se consumen, como de los requerimientos específicos determinadas por la edad, el género, la actividad física, el embarazo, la lactancia, las infecciones y de manera importante eficiencia de la utilización de los nutrientes. La malnutrición puede ser el resultado de carencias de macronutrientes y micronutrientes, el efecto de enfermedades infecciosas, así como de la ingesta excesiva de alimentos. (Pedraza, 2004)

Desnutrición infantil

La desnutrición se define como el estado fisiológico que resulta de la falta de absorción o de ingesta de nutrientes acordes con las necesidades biológicas del organismo. (Pedraza, 2004) La desnutrición se puede dividir en aguda (bajo peso para la edad o para la talla) y crónica (baja talla para la edad). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud para (OMS), se considera una desnutrición aguda grave, cuando los niños menores de 5 años están por debajo de -3 en el puntaje Z para el parámetro de peso para la talla para su edad, además pueden presentar edema abdominal si como una circunferencia de brazo medio superior <115 mm. (Pham et al., 2019) Esta desnutrición aguda grave puede clasificarse en: marasmo, que se caracteriza por una pérdida de hasta el 60% de masa muscular y de grasa subcutánea, y Kwashiorkor, que se caracteriza por una pérdida de hasta el 80% del peso corporal y la presencia de edema abdominal; tanto marasmo como Kwashiorkor se encuentran acompañados de otros trastornos fisiológicos,

cambios en el metabolismo para la adaptación a la baja ingesta de nutrientes. (Pham et al., 2019) La desnutrición se atribuye a condiciones de pobreza, falta de acceso a agua potable, déficits en el saneamiento, una alta prevalencia de enfermedades infecciosas y una inseguridad alimentaria (falta de acceso a los grupos de alimentos que constituyen una dieta equilibrada). (Bhutta et al., 2017)

En el mundo, la desnutrición causa el 45% de muertes de niños menores de 5 años, principalmente en países y regiones subdesarrolladas. En México, en el año 2018, se reportó que el 4.4% de los menores de 5 años presentaban bajo peso, 14.9% desnutrición crónica y el 1.5% desnutrición aguda. (Cuevas-Nasu et al., 2019) De igual manera, se observó que en los hogares de mayores carencias socioeconómicas la desnutrición crónica era del 17.5% y en los hogares indígenas del 24.5%, observándose una disminución en estos últimos hogares del 9% con respecto al 2012 donde la prevalencia fue del 33.5%. (Cuevas-Nasu et al., 2019)

En el 2018, solo el 44.2% de los hogares encuestados en la ENSANUT (Encuesta de Salud y Nutrición) reportó tener una seguridad alimentaria; la cual consiste en garantizar acceso a todos los grupos alimentarios que conforman una dieta adecuada y equilibrada, que pueda garantizar una correcta nutrición. Esta encuesta también reportó que el 32.9% y el 22.6% de los hogares tienen inseguridad alimentaria leve y moderada, respectivamente. (INEGI, 2018)

Generalidades de la microbiota

Se ha descrito que en el cuerpo humano existen diversos nichos colonizados por microorganismos mutualistas y comensales que mantienen una estrecha relación con el hospedero, como en el tracto gastrointestinal, la piel, la boca, el sistema respiratorio y la vagina. (Ursell et al., 2013) A este conjunto de microorganismos simbióticos se les denomina “microbiota humana”, por otro lado, al potencial genético que confieren estos simbioses se le ha definido

como “microbioma humano”. (Ursell et al., 2013) La microbiota humana está constituida por alrededor de 10 a 100 mil millones de bacterias mutualistas y comensales (bacteriota), donde múltiples estudios han confirmado que los microorganismos que conforman esta bacteriota varían entre sí dependiendo del sitio del cuerpo en el que se establecen, así como también entre un estado de salud o de enfermedad. (Ursell et al., 2013)

De acuerdo a múltiples análisis metagenómicos, se ha confirmado que la microbiota realiza diversas funciones que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del hospedero, debido a que ésta cuenta con los genes necesarios para metabolizar sustancias esenciales para nuestro organismo, las cuales no podrían ser sintetizadas de otra manera. (Turnbaugh et al., 2007) Sin embargo, una limitante importante de la metagenómica es el poder vincular genes a organismos particulares, o a clasificaciones taxonómicas, para asociarlos con funciones metabólicas particulares. (Ursell et al., 2013)

Anteriormente, se había tratado de demostrar la presencia de un conjunto “central” de taxones bacterianos específicos, presentes en al menos la mitad de los sujetos estudiados, pero es difícil probar que un taxón está ausente mediante secuenciación y procedimientos de agrupamiento. Es por esta razón que surgió la propuesta de que lo que se comparte entre los sujetos es un “bacterioma central” y no una “bacteriota central”, ya que diversas evidencias han demostrado que se comparten subconjuntos de genes de vías metabólicas microbianas entre los individuos, pero no los taxones bacterianos. (Ursell et al., 2013) Todo esto ha permitido explicar porque distintas especies microbianas son capaces de activar vías metabólicas similares y generar ambientes metabólicos parecidos, y mostrando que no hay necesidad de un bacteriota central

Bacteriota intestinal

La microbiota intestinal en adultos constituye alrededor del 70% de la microbiota total del cuerpo, se estima que pesa aproximadamente 1.5

kilogramos y que está compuesta por un número que supera 10 veces el de las células del hospedero; incrementando su concentración de bacterias comensales de la luz del estómago hacia el colon y recto, lugares donde alcanza su máxima concentración. (Pascale et al., 2018) Cada individuo posee su propia huella bacteriana (bacteriota) debido a que en el intestino existe una amplia variabilidad de microorganismos los cuales son adquiridos de diversas maneras, sin embargo, se ha identificado un “núcleo común” de alrededor de 57 especies, donde los dos phyla dominantes son Bacteroidetes y Firmicutes, que, a su vez, constituyen el 90% de las categorías filogenéticas que componen la mayor parte de las bacterias del intestino. (Pascale et al., 2018)

Se ha descrito que las bacterias de la microbiota gastrointestinal contienen principalmente genes que codifican para moléculas relacionadas con ciertas rutas metabólicas; como las involucradas en el metabolismo de xenobióticos, glucanos y aminoácidos, así como en la biosíntesis de la vitaminas K y del complejo B. (Turnbaugh et al., 2007) Estas bacterias comensales adquieren su energía mediante la degradación de los carbohidratos que no son digeridos por el hospedero, los cuales al llegar al colon son fermentados por las bacterias en gases como hidrógeno y metano, o en ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato. (Pascale et al., 2018)

La degradación de los carbohidratos que no son digeridos por el hospedero se lleva a cabo principalmente por las bacterias del phylum Bacteroidetes produciendo primordialmente acetato y propionato, mientras que las bacterias del phylum Firmicutes producen butirato. El acetato se absorbe y se transporta a nivel periférico, donde posteriormente será utilizado como sustrato para la síntesis de colesterol, mientras que el propionato es un sustrato importante en la gluconeogénesis. Se ha demostrado que el butirato es una de las principales fuentes de energía para las células epiteliales del colón, incrementando la sensibilidad de estas células a la insulina brindando también acción antiinflamatoria, la cual potencialmente parece tener una acción “anti-obesogénica”. (Pascale et al., 2018) La producción de butirato es importante

para el mantenimiento e integridad del tejido colorrectal ya se ha observado que contribuye a la regeneración de los enterocitos, brindando una protección contra el daño de este epitelio por diferentes agentes etiológicos. (Conlon & Bird, 2015)

Por otro lado, la microbiota también es esencial para los patrones de motilidad del tracto gastrointestinal, ya que las alteraciones en ésta resultan en cambios del peristaltismo. (Beamish et al., 2011) Estas alteraciones del peristaltismo se deben tanto a la liberación de sustancias bacterianas o productos finales de su fermentación, como a factores neuroendócrinos intestinales que también pueden tener un efecto e inducir la secreción de mediadores de la respuesta inmune intestinal. (Quigley, 2011) También se han observado que varios compuestos de la microbiota intestinal inducen una mayor proliferación celular, contribuyendo a la reparación epitelial mediante la señalización mediada por receptores tipo Toll (TLR), como es el caso de la activación del TLR2 (presente en las células epiteliales intestinales), lo cual puede modificar la absorción de los nutrientes. (Cario et al., 2004)

En los últimos años, se ha descrito que en el adulto las bacterias comensales residentes del intestino están adaptadas a este ambiente, ya que han desarrollado redes ecológicas directas o indirectas con otras bacterias para adquirir nutrientes. Por ejemplo, especies de *Lactobacillus* y *Eubacterium dolichum* carecen de la capacidad de sintetizar aminoácidos, por lo tanto, adquieren estas moléculas de su hábitat intestinal. Las bacterias metanógenas, anaerobios obligados, obtienen su energía de las moléculas de hidrógeno, un producto de desecho de otros anaerobios obligados. Las interacciones hospedero-microbiota, microbiota-microbiota y microbiota-ambiente dictan la distribución de los comensales a lo largo del tracto intestinal. (Cario et al., 2004; Kamada et al., 2013) La diversidad de la microbiota intestinal permite aprovechar al máximo los nutrientes proporcionados por la dieta; debido a que facilitan la digestión por diversas

vías metabólicas alternativas que no están presentes en el genoma humano. (Kamada et al., 2013)

Se ha descrito que la enzima hidrolasa de las sales biliares, es producida por varias especies bacterianas de la microbiota intestinal como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, por lo tanto, estas bacterias hidrolizan las sales biliares presentes en el intestino, evitando así la recaptación de estas moléculas por el enterocito y facilitando su eliminación, cuyas posibles implicaciones es la disminución en la absorción de los lípidos por el intestino, esto es debido a que las sales biliares cumplen con la función de solubilizarlos para facilitar su digestión y absorción. (Ley et al., 2009; Pascale et al., 2018) Las fitasas bacterianas presentes en el intestino ayudan a la degradación del ácido fólico, el cual está presente en los cereales, las legumbres y las semillas. El ácido fólico, en el intestino forma complejos insolubles con minerales como magnesio y fosfato lo cual evita la absorción de éstos por el hospedero, por lo que las fitasas liberan estos minerales de los complejos para que ahora puedan ser utilizados por el hospedero. Por otro lado, las enzimas que degradan las mucinas ayudan a satisfacer las necesidades de las bacterias y a una renovación normal de la mucosa intestinal. (Pascale et al., 2018)

Los nutrientes disponibles para la microbiota son unos de los factores críticos que definen la composición y la distribución de ésta en el hospedero. El intestino delgado es rico en monosacáridos, disacáridos y aminoácidos, este ambiente es el adecuado para el crecimiento de *Proteobacterias* y *Lactobacilares*. En la parte distal del intestino delgado (íleon terminal), se absorbe los azúcares simples, por lo que las fuentes de energía disponibles para el crecimiento bacteriano son diferentes del resto del intestino delgado, lo cual resulta en un cambio en la composición bacteriana. Más allá de la válvula ileocecal, la gran mayoría de los carbohidratos disponibles son polisacáridos no digeribles por el hospedero, porque en esta región las poblaciones dominantes incluyen bacterias del género *Bacteroides* y especies de la familia *Clostridiales*, las cuales contienen enzimas que pueden

descomponer polisacáridos no digeribles para utilizarlos como fuente de energía **Figura 1.** (Kamada et al., 2013)

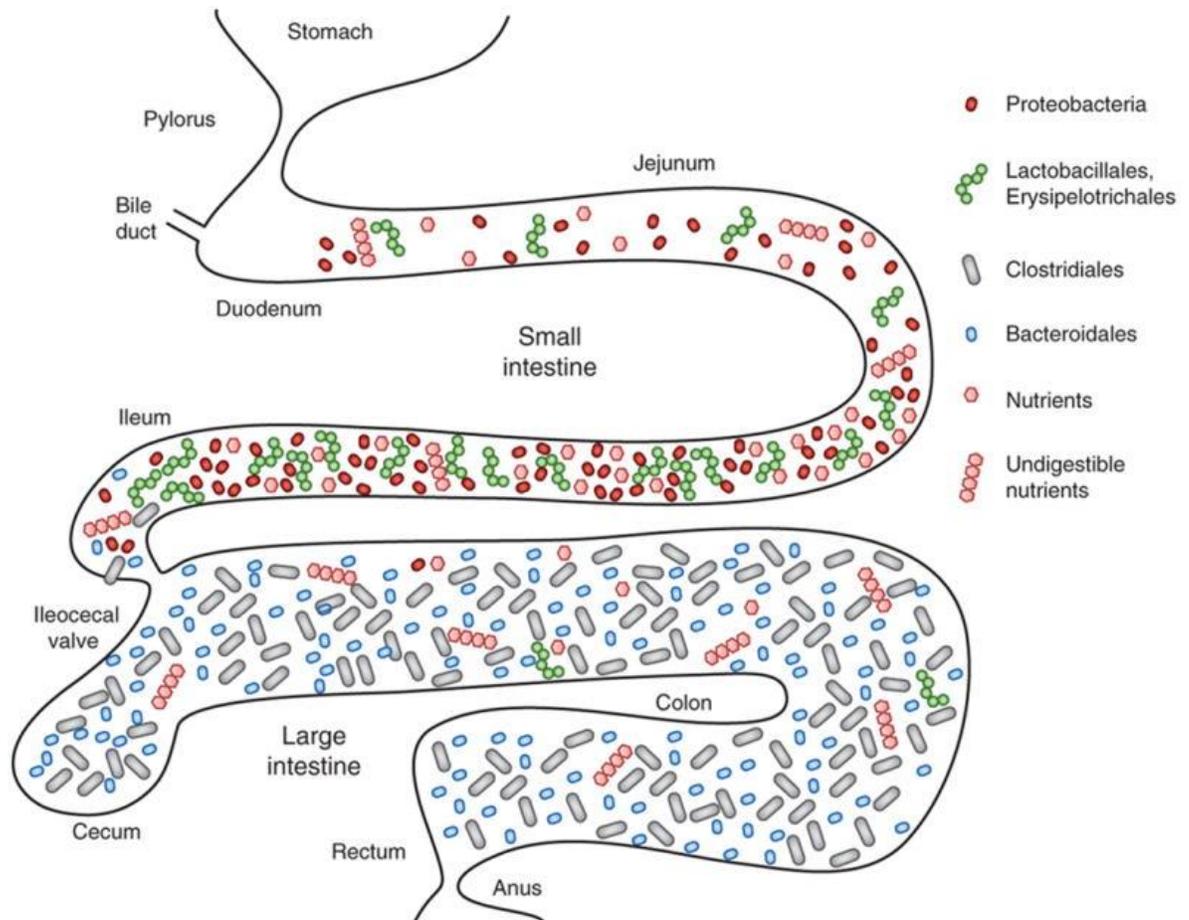


Figura 1. Distribución a lo largo del intestino de los principales grupos bacterianos. El intestino delgado es rico en nutrientes que son utilizados para el crecimiento tanto por el hospedero como por la bacteriota. Las Proteobacterias (principalmente las *Enterobacterias*), Lactobacilares y Erysipelotrichales (especialmente *Turicibacter*) son dominantes en el intestino delgado. En contraste, el intestino grueso es pobre en nutrientes y por lo tanto alberga una cantidad mucho menor de estas bacterias, mientras que esta enriquecido en especies de las familias *Bacteroidetes* y *Clostridiales* ya que pueden utilizar como fuentes de energía fibras que el hospedero no puede. (Kamada et al., 2013)

Dependiendo de las necesidades energéticas de las bacterias patógenas, éstas pueden competir por recursos con las bacterias nativas. Debido a esto la bacteriota comensal ha desarrollado mecanismos para evitar la colonización intestinal por patógenos, tales como la producción de bacteriocinas (toxinas) que inhiben el crecimiento de miembros de la misma especie bacteriana o similar. (Kamada et al., 2013) Otra estrategia de los comensales, es el consumo preferencial de nutrientes necesarios para el crecimiento de patógenos competidores, causando la inanición de los patógenos y su muerte. El consumo de oxígeno residual por anaerobios facultativos comensales, como las *Enterobacteriaceae*, puede inhibir factores de virulencia en patógenos que requieren oxígeno. (Kamada et al., 2013)

Una característica de los enterocitos ante patógenos bacterianos es el inducir inflamación con el fin de eliminarlos, ya que no se induce inflamación ante comensales bacterianos, esta estrategia está en equilibrio con el hecho de que algunos mediadores de inflamación a su vez inducen factores de virulencia en estos patógenos, los cuales pueden romper el equilibrio y colonizar el tracto intestinal produciendo enfermedad como la diarrea. Tanto la inflamación intestinal junto con la diarrea disminuyen la diversidad de la microbiota e incrementa la proliferación de patógenos debido a una reducción en la competencia. (Lupp et al., 2007)

Primer encuentro con la microbiota

Actualmente, diversos estudios han mostrado una colonización microbiana de la madre hacia el feto in útero, ya que se ha documentado una comunidad microbiana en el meconio (primeras heces del recién nacido). La placenta y el líquido amniótico muestran una firma similar al meconio caracterizada por una baja diversidad de Proteobacterias. (Kundu et al., 2017)

El tracto gastrointestinal del recién nacido contiene diversos nichos para ser colonizados por microorganismos. Esta colonización depende del parto, donde se adquiere una población diferencial dependiendo de la vía de nacimiento,

por vía vaginal se adquiere una bacteriota similar a la de la vagina de la madre (*Lactobacillus* y *Prevotella* spp), mientras que por cesárea la bacteriota se asemeja al de la piel de la madre (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*). (Kundu et al., 2017; Ursell et al., 2013) Se ha observado que los niños nacidos por cesárea mantienen una complejidad microbiana menor, hasta los 12 meses, comparados con los nacidos por vía vaginal. Diversos estudios han mostrado una alteración en el patrón natural en la adquisición de la bacteriota. Por ejemplo, en los niños prematuros, antes de las 37 semanas de gestación, particularmente en aquellos que han pasado estadías prolongada en el hospital, en algunos casos sometidos a respiración artificial y alimentados de manera parenteral, la bacteriota se caracteriza por estar constituida principalmente de anaerobios, particularmente del género *Clostridium*, lo cual puede afectar la salud tanto a corto como a largo plazo de estos niños. (Milani et al., 2017) Se ha descrito que la microbiota intestinal de los niños prematuros es diferente en su composición y funcionalidad, comparada con la de los niños no prematuros, mostrando un incremento en genes asociados con la biodegradación y metabolismo de xenobióticos, metabolismo de lípidos (enriquecimiento de derivados de ácidos biliares) y se caracterizan por microorganismos con bajo metabolismo energético y de biosíntesis de vitaminas. (Milani et al., 2017)

También se ha descrito que el tipo de alimentación del recién nacido (seno materno o fórmula) tiene una influencia directa en la composición de la microbiota. Tanto el calostro como la leche materna proveen bacterias simbióticas y probióticas para el intestino del lactante, lo cual resulta en un incremento en la diversidad y la funcionalidad de la bacteriota. Cabe destacar que cada madre en su leche alberga un patrón microbiano único, donde la mayoría son de los géneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*. Por otro lado, los niños alimentados con fórmulas lácteas muestran una microbiota intestinal diferente en esta etapa, (Kundu et al., 2017) puesto que están expuestos a diferentes carbohidratos y micronutrientes, favoreciendo patrones de colonización diferentes, que conlleva a una mayor

diversidad dominada por los géneros *Estafilococos*, *Bacteroides*, *Enterococos*, *Enterobacterias* *Clostridium* y *Atopobium*. (Milani et al., 2017)

El microbioma intestinal del lactante puede influir en muchos órganos y sistemas, como es el caso del “eje microbioma-intestino-cerebro”, en el que el sistema nervioso entérico participa en funciones intestinales como la peristalsis, el flujo sanguíneo intestinal y la secreción epitelial. El sistema nervioso entérico se comunica bidireccionalmente con el sistema nervioso central mediante la transmisión neuronal a través de tractos parasimpáticos y simpáticos vágales, (Kundu et al., 2017) además el sistema nervioso entérico se organiza en una red de ganglios interconectados distribuidos en dos capas dentro de la pared intestinal: la mientérica externa y la submucosa interna. (Moreira et al., 2012) La disbiosis (alteración de la microbiota) se ha asociado con el estrés, el cual tiene un perfil neuroquímico particular; con base en estas observaciones se ha propuesto un mecanismo a través del cual la microbiota puede influir en la señalización del sistema nervioso entérico y el sistema nervioso central, incluidas las rutas neuronales en las cuales se ha involucrado al nervio vago en la comunicación entre la microbiota y el cerebro. (Grenham et al., 2011)

Se ha observado, una disminución de *Bifidobacterias* en el intestino de los infantes al introducir alimentos sólidos. Puesto que estas *Bifidobacterias*, son necesarias para el procesamiento de los oligosacáridos de la leche materna. La composición del microbioma intestinal del infante tiene cambios significativos que van relacionados con el cambio de dieta, en el cual se incrementa el conjunto de genes asociados con la digestión de los polisacáridos y la biosíntesis de vitaminas; (Ursell et al., 2013) de manera importante durante esta etapa también se lleva a cabo la maduración del sistema inmune del infante. (Kundu et al., 2017)

La adquisición de la microbiota del infante continua y varía dependiendo de diversos factores como: el estilo de vida (dietas variadas), el entorno del hospedero, estado fisiológico (incluyendo el del sistema inmune) y patológico

(presencia de alguna enfermedad), así como la presencia transitoria de microorganismos incapaces de colonizar persistentemente un hábitat. (Turnbaugh et al., 2007; Ursell et al., 2013) **Figura 2**

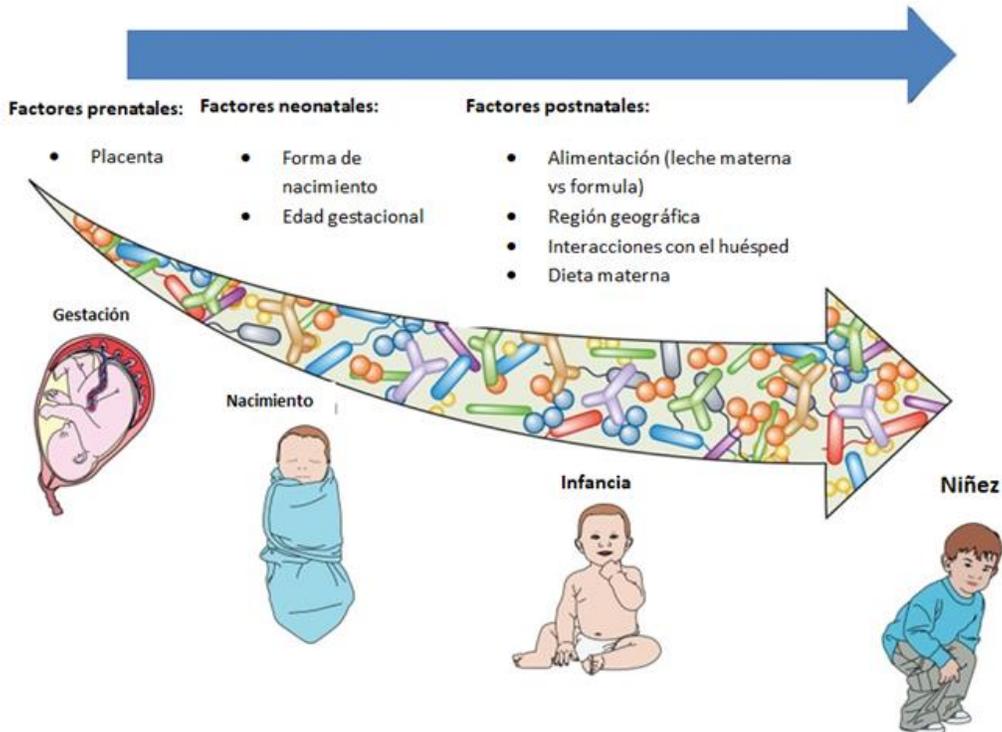


Figura 2. Adquisición y composición de la microbiota, desde la gestación hasta la niñez. La representación esquemática muestra una lista de factores prenatales, neonatales y postnatales que contribuyen a la composición intestinal bacteriana del infante. (Milani et al., 2017)

La composición de la microbiota intestinal depende directamente de la dieta del hospedero

Se ha demostrado que las dietas determinan de manera importante la ecología microbiana del intestino, ya que el tipo de nutrientes ejerce una presión de selección sobre el tipo de especies que lo colonizan. (Ley et al., 2009) A pesar de que existen algunos mamíferos que también tienen dietas omnívoras similares a la de los humanos, se ha demostrado que no poseen una microbiota similar. Esto se debe a que la diversidad de los linajes bacterianos,

en la microbiota humana, están influenciados por la variedad de la dieta, así como por la cantidad de alimentos y su procesamiento. (Ley et al., 2009) Por ejemplo, se ha descrito que las heces de los individuos vegetarianos presentan una baja abundancia relativa de bacterias de la familia Enterobacteriaceae; esto se debe a que el alto consumo de fibras resulta en un incremento de los AGCC, lo cual conlleva a una disminución del pH intestinal, condiciones que no son adecuadas para el crecimiento de las bacterias de esta familia. (Zimmer et al., 2012) En contraste, dietas ricas en proteína muestran una alta abundancia relativa de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, lo que conlleva al incremento de la actividad de enzimas bacterianas como la β -glucuronidasa y la nitroreductasa, esta última enzima puede producir metabolitos que inducen respuestas inflamatorias. (Brown et al., 2012) Adicionalmente, un estudio comparativo entre la bacteriota de niños europeos y de niños de una aldea africana, los cuales consumen una dieta rica en proteínas y una dieta alta en fibras, respectivamente; mostró que los niños europeos presentan una marcada reducción del phylum Bacteroidetes y un enriquecimiento de la familia Enterobacteriaceae, mientras que los niños africanos mostraron un enriquecimiento del phylum Bacteroidetes, una disminución de Firmicutes y una mayor producción de AGCC. (De Filippo et al., 2010)

Por otro lado, se ha descrito que la alteración en la cantidad de kilocalorías de la dieta en adultos delgados induce un cambio en la abundancia entre los phyla Bacteroidetes y Firmicutes, lo que resultó en un incremento del phylum Firmicutes y una disminución de Bacteroidetes al aumentar la ingesta de calorías, similar a lo que se ha observado en individuos que consumen dietas altas en grasas. (Jumpertz et al., 2011) Las diferencias entre la composición de la microbiota pueden resultar en diferentes capacidades metabólicas para utilizar los compuestos de la dieta, así como a diferentes riesgos para adquirir enfermedades. (Conlon & Bird, 2015)

La microbiota y el estatus nutricional del niño

Varios estudios han mostrado que los sujetos con desnutrición, sobrepeso, obesidad, diabetes etc., suelen presentar disbiosis, por lo tanto, los beneficios de la microbiota puede reducirse. (Méndez-Salazar et al., 2018) Se ha demostrado que los niños con desnutrición moderada y severa tienen una microbiota menos diversa y madura que los niños sin desnutrición. (Bhutta et al., 2017; Méndez-Salazar et al., 2018)

En un estudio realizado en México, en el cual se determinó y comparo la diversidad de la microbiota intestinal en niños con desnutrición vs. niños con un correcto estado nutricional y con obesidad, se observó que el grupo con correcto estado nutricional tuvo mayor diversidad microbiana que los grupos con desnutrición y con obesidad. De igual manera se observó que el grupo de niños con desnutrición mostro mayor abundancia de Firmicutes (57.9%), que el grupo con correcto estado nutricional (43.2%); los grupos de niños con desnutrición y con obesidad obtuvieron proporciones más bajas de Bacteroidetes (38.3 % y 33%, respectivamente) en comparación con el grupo con correcto estado nutricional. En niños obesos el aumento de Proteobacterias representa un desequilibrio de la comunidad bacteriana intestinal. En particular, el consumo elevado de grasas estimula la proliferación de Proteobacterias, los cuales pueden ser un criterio de diagnóstico para la disbiosis. En este mismo estudio, se estableció que la familia *Lachnospiraceae* del phylum de Firmicutes estaba sobrerrepresentada en los niños con desnutrición, está familia se ha asociado con la inducción de adiposidad, aumento de peso y diabetes, por lo tanto, se sugiere que esta familia bacteriana contribuye a un proceso de adaptación que protege contra la mala nutrición, mejorando el balance energético. (Méndez-Salazar et al., 2018) Estos resultados muestran la importancia de determinar si es posible llegar hasta nivel de género y ya no solo a nivel de phylum y familias de los OTUs que conforman la bacteriota intestinal ya que grupos de bacterias pertenecientes al mismo phylum pueden tener vías metabólicas diferentes que cumplan con funciones diferentes, de aquí la necesidad de incrementar la profundidad de identificación de los taxones en la bacteriota intestinal.

Además, se ha observado que en los niños sanos la microbiota intestinal suele ser muy diversa, durante los episodios diarreicos se pierde esa diversidad con un cambio en la composición de la microbiota, mostrando la mayor diferencia en el aumento del phylum de Proteobacterias y una menor abundancia de bacterias anaerobias lo que conlleva a un aumento de bacterias aerobias. (Braun et al., 2017; Fan et al., 2020; Gallardo et al., 2017; Solano-Aguilar et al., 2013)

El síndrome diarreico

El síndrome diarreico se define como un incremento en las deposiciones del patrón habitual del niño, o el presentar más de tres veces evacuaciones líquidas o semi líquidas, al día, las cuales pueden ir acompañada de dolores abdominales o fiebre. (OMS, 2017) El síndrome diarreico es más prevalente y causa mayor morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años, sobre todo de países subdesarrollados o en regiones con bajos ingresos y con malas condiciones de salubridad (suministro de agua potable, higiene ambiental y saneamiento deficientes) **Figura 3**. Las enfermedades diarreicas infecciosas, pueden ser causadas por varios agentes etiológicos como virus, bacterias y parásitos. Con base en las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con diarrea, se pueden clasificar en: (Black et al., 2016; Gomes et al., 2016)

1. Diarrea acuosa, la cual se clasifica de acuerdo con el volumen de evacuaciones con respecto al peso corporal: leve, cuando el volumen es inferior al 5% del peso corporal, moderada, cuando el volumen se encuentra entre el 5% al 10%, y grave, cuando el volumen supera el 10%. La diarrea acuosa grave, puede producir choque hipovolémico que puede llevar a la muerte; se caracteriza por una alta pérdida de líquidos que resulta en una deshidratación severa, disminución de la

presión arterial, insuficiencia circulatoria y disfunción de diversos órganos.

2. Diarrea con sangre, se define como cualquier episodio de evacuación disminuida de consistencia (semilíquida o líquida) en las que hay sangre visible. El síndrome disentérico es una entidad clínica cuyas características incluyen numerosas evacuaciones con escaso material fecal, con moco y sangre, generalmente acompañada de cólicos, tenesmo (urgencia de defecar) y fiebre. (Fernández García, et al., 2004)
3. Diarrea persistente, aquellos episodios que duran más o 14 días, que pueden dañar la mucosa intestinal, causando mala absorción de nutrientes, pérdida de peso y desnutrición.

Se ha observado que el síndrome diarreico alcanza su mayor tasa de incidencia entre los 6 y los 11 meses de vida del niño (período de destete). Esto se debe a que los primeros meses de vida (< 6 meses) a través de la leche materna se transfieren inmunoglobulinas, lactoferrina y lisozima protegiendo al bebé de las infecciones por patógenos que causan diarrea. (Black et al., 2016) En el Global Enteric Multisite Study (GEMS), el agente etiológico bacteriano, ocupa el segundo lugar en incidencias de enfermedades diarreicas, en aquellos países que no han introducido de manera masiva la vacunación contra rotavirus. (Kotloff et al., 2013) En México, se introdujo la vacuna de rotavirus a partir de mayo de 2007 en niños menores de 6 meses, lo que trajo como resultado la disminución significativa de las muertes debidas a la diarrea causada por rotavirus. (Collada et al., 2020)

En México, en el 2019 el síndrome de diarrea fue la segunda causa de morbilidad en niños menores de 5 años, con una incidencia de 995,817 casos, (Anuario de morbilidad 2019) y con una tasa de mortalidad en menores de 1 año de 27.78 y de 3.47 en niños de 1 a 4 años, por cada 100,000 niños. (Ríos-Muñiz et al., 2019) Como se muestra en la **Figura 4**, en México, durante el periodo de 2006 al 2018, las enfermedades diarreicas en los niños de 0 a 4

años no han disminuido su incidencia significativamente y este síndrome mostró una mayor incidencia en los niños que en las niñas. (INEGI, 2018)

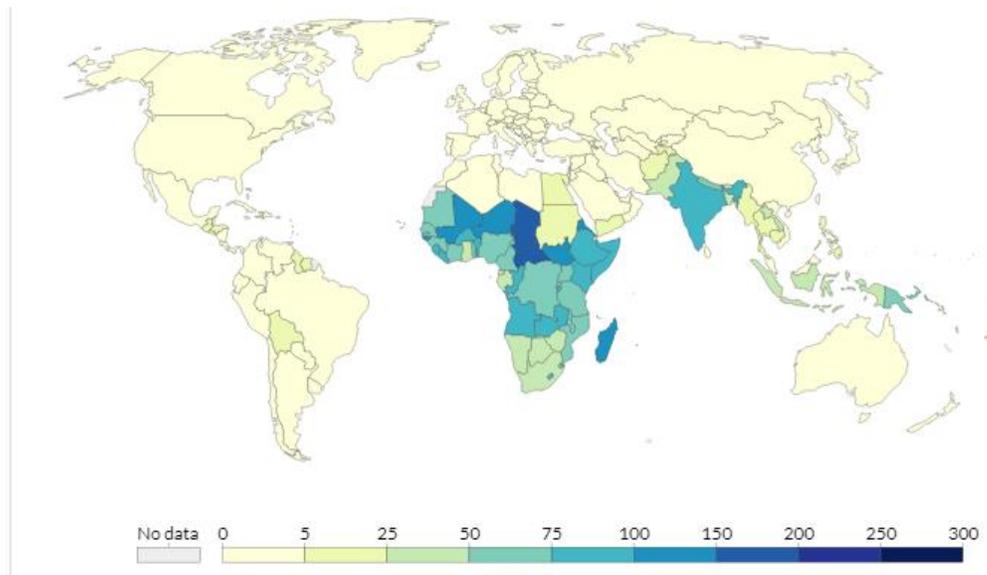


Figura 3. Tasa de mortalidad por enfermedades diarreicas, 2017. El número anual de muertes por enfermedades diarreicas por cada 100.000 personas. (Dadonaite et al., 2019)

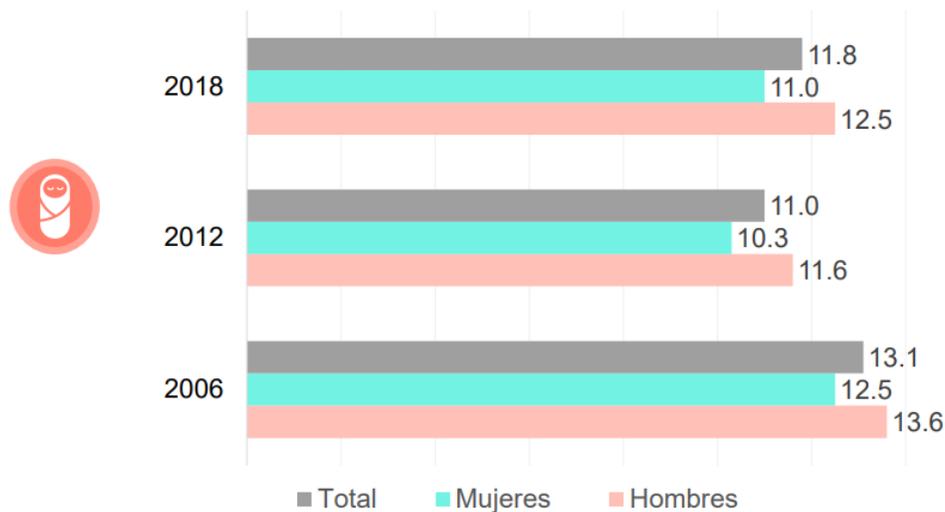


Figura 4. Porcentaje de la población de 0 a 4 años que presentó diarrea en las dos semanas previas a la entrevista, por sexo. (2006-2018) (INEGI, 2018)

Desnutrición y diarrea “un círculo vicioso”

La desnutrición y la mortalidad por diarrea tienen una asociación bidireccional. La desnutrición causa inmunodeficiencia y una mayor susceptibilidad a infecciones como la diarrea. La diarrea a su vez causa desnutrición a través de la disminución del apetito y una mala absorción, por lo tanto, menor ingesta de alimentos y una pérdida de nutrientes, lo que conlleva a una pérdida de peso. (Gebreyesus Wasihun et al., 2018) Se ha documentado, que en los niños desnutridos la prevalencia de la diarrea es más alta y a menudo las manifestaciones clínicas son más severas, esto debido a la inmunodeficiencia que presentan, ocasionando dificultades en su capacidad para defenderse contra los patógenos. En la **Figura 5**, se muestran los factores de riesgo tanto como para la predisposición a la desnutrición, así como a padecer diarrea. (Levy Farín, 1980)

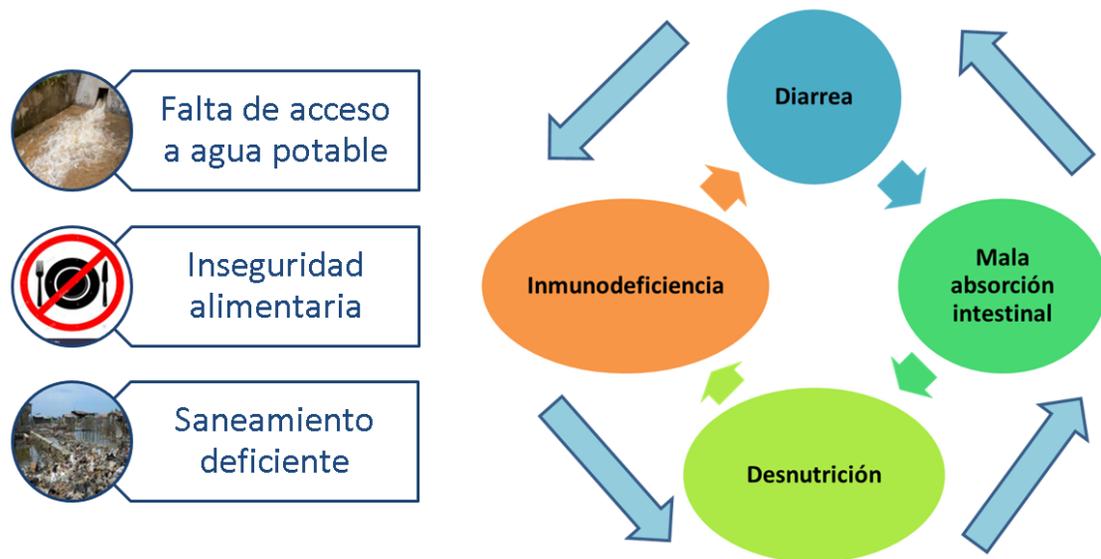


Figura 5. Factores de riesgo que predisponen a una desnutrición y a padecer diarrea.

La diarrea produce un deterioro nutricional del niño, lo cual resulta en una pérdida de talla y peso con respecto a la esperada para la edad del infante. Es importante recordar que cuando un infante presenta el síndrome de diarrea,

éste debe recibir una alimentación adecuada para su pronta recuperación. (Levy Farín, 1980)

Se ha descrito que, en los niños desnutridos y con diarrea, los patógenos más frecuentemente identificados son: *E coli* enteroagregativa (EAEC) (Acosta-Muñiz et al., 2015; Opintan et al., 2010; Tickell et al., 2017), *E. coli* entorotoxigénica (ETEC) productora de toxina termoestable (Mondal et al., 2009; Tickell et al., 2017) y *E. coli* enteropatógena típica (EPECt) en comparación con los niños sin desnutrición y con diarrea en donde son más prevalentes Rotavirus, *Vibrio cholerae* y *Giardia lamblia*. (Tickell et al., 2020)

Se ha reportado que los niños con desnutrición aguda que cursaron con diarrea moderada causada por EPECt y *E. coli* productora de toxinas shiga (STEC), duplicaron el riesgo de que el episodio de diarrea pasara a ser grave, comparado con los niños sin desnutrición. Se observó una mayor letalidad en los niños con desnutrición que en los niños sin desnutrición que presentaron episodios de diarrea causados por: *Shigella*, EPECt, STEC y *Entamoeba histolytica*. (Tickell et al., 2020)

En un artículo que incluye varios estudios de búsqueda intencionada de los PEDs realizado en Perú, en niños menores de 5 años con diarrea, se identificó en los infantes el: 9.9% EAEC, 8.5% EPEC, 6.9% ETEC, 4.8% *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), 0.8% STEC y 0.6% *E. coli* enteroinvasora (EIEC), en un total de 4243 muestras. (Ochoa et al., 2011)

Epidemiología del síndrome de diarrea en infantes en el estado de Yucatán

En nuestro país como en el mundo, se han realizado pocos estudios de búsqueda intencionada de agentes patógenos causantes de diarrea. Nuestro grupo de investigación realizó dos estudios de diarrea aguda en niños que requirieron hospitalización, en Mérida Yucatán, el primero se realizó del 2008-2009 y del 2010-2011, en donde se identificaron a los PEDs como los

principales patógenos causantes de diarrea aguda, por arriba de Rotavirus, *Salmonella* y *Shigella* spp. Los principales PEDs identificados fueron: DAEC en un 35%, EAEC en 24% y EPEC en 19%. (Patz-Vargas et al., 2015) El segundo se realizó del 2010 al 2014, en donde también se identificaron a los PEDs como los principales patógenos causantes de diarrea aguda, se reveló que DAEC fue el patógeno más prevalente (36.6%), seguido de EAEC (20.3%), EPECa (15.9%), ETEC (12.7%), EPECt (1.8%) y EIEC (0.7%). (Meza-Segura, 2017)

En tanto que la ENSANUT 2012, identificó una prevalencia nacional de diarrea aguda en la población menor de cinco años de 11.0%, para Yucatán esta fue de 17.7%. En contraste, para la entidad esta cifra fue de 12.5% en 2006, lo que muestra un considerable incremento de 41.6%. (ENSANUT, 2012)

Escherichia coli

En 1884, el microbiólogo y pediatra, Theodor Escherich, realizó un estudio para caracterizar los microbios presentes en el intestino de infantes. En este estudio identificó una bacteria de rápido crecimiento, a la que denominó *Bacterium coli commune*, conocida en la actualidad como *Escherichia coli*, la cual está considerada un componente de la microbiota intestinal. El nicho de *E. coli* es la capa delgada de la mucosa que recubre el intestino grueso. En esta capa mucosa, *E. coli* crece formando una biopelícula junto con otras especies de microorganismos con los que compite por los nutrientes. (Blount, 2015)

E. coli es un bacilo Gram negativo que mide aproximadamente 1 μm de largo por 0.35 μm de ancho, esto puede variar dependiendo de la cepa y de sus condiciones de crecimiento, suele tener flagelos para poder moverse en su entorno y un variado repertorio de pilis que le permiten adherirse tanto a las superficies como a las células. *E.coli* es un aerobio facultativo, lo que significa que puede crecer en tanto en presencia como en bajas concentraciones de

oxígeno. *E. coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae que incluye otros patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Serratia*. (Blount, 2015)

Escherichia coli, coloniza el tracto gastrointestinal de los humanos poco después del nacimiento. (Kaper et al., 2004) La relación *E.coli*-hospedero se basa en el mutualismo, en el cual el hospedero brinda nutrientes y condiciones ideales para la supervivencia de *E. coli*, mientras que *E. coli* produce las vitaminas K y B12, que no produce el hospedero las cuales requiere como micronutrientes. (Lawrence & Roth, 1996) Sin embargo, existen cepas de *E. coli* que han adquirido factores de virulencia específicos que les han permitido colonizar nuevos nichos, así como producir diversas enfermedades en el hospedero. (Kaper et al., 2004)

El tamaño del genoma de *E. coli* es muy variable entre cepas, mientras que las cepas comensales tienen un genoma de ~4.5 millones de pares de bases y 4000 genes, las cepas patógenas pueden tener genomas de más de 5.9 millones pb y 5500 genes. Esta variación se debe a la presencia en las cepas patógenas de profagos, elementos móviles, plásmidos e islas de patogenicidad que les confieren a estas cepas capacidades metabólicas diferentes, así como virulencia. (Blount, 2015; Gomes et al., 2016)

Dependiendo en la región del cuerpo donde estas cepas virulentas de *E. coli* producen enfermedad se han dividido en extraintestinales e intestinales. Los PEDs se han clasificado en seis patotipos con base en factores de virulencia específicos: EPEC que incluye dos subgrupos (EPECt, EPECa), STEC donde se incluye al subgrupo de las enterohemorrágicas (EHEC), ETEC, EAEC, EIEC y DAEC. (Kaper et al., 2004). A continuación, se describen las características de los patotipos que se incluyen en el presente estudio.

***E. coli* de adherencia difusa**

E. coli de adherencia difusa (DAEC) causa daños en las células epiteliales, incluida la pérdida de la estructura de las microvellosidades, la alteración de

las actividades enzimáticas de las proteínas y la pérdida de las uniones adherentes, lo que resulta en enfermedades diarreicas y daño en el epitelio intestinal, lo que contribuye al desarrollo de otras enfermedades intestinales. (Meza-Segura & Estrada-Garcia, 2016)

DAEC, se define por su adherencia difusa (DA) sobre células epiteliales HEP-2, donde la adherencia se produce en toda la superficie, mostrando un patrón disperso, el cual está mediado por la presencia de las adhesinas Afa/Dr/F1845, las cuales están codificadas por los operones afa/dra/daa, respectivamente. (Meza-Segura & Estrada-Garcia, 2016) Estos operones están formados por 5 genes diferentes (A, B, C, D, E), que codifican para un regulador transcripcional, una chaperona, un usher, una invasina y una proteína estructural, respectivamente. (Meza-Segura & Estrada-Garcia, 2016)

DAEC cuenta con adhesinas afimbriales (Afa-I, Afa-II, Afa-III, Afa-V, Afa VII, Afa VIII y Dr-2) y adhesinas fimbriales (Dr y F1845). Las adhesinas fimbriales se unen al factor acelerador del decaimiento (DAF) y a las moléculas de adhesión celular del antígeno carcinoembrionario humano (hCEACAM). (Meza-Segura & Estrada-Garcia, 2016) DAF es una glicoproteína que se encuentra expresada en la superficie apical de las células epiteliales del intestino. Después de la unión entre las adhesinas y DAF, se induce al rearrreglo del citoesqueleto en las células epiteliales, lo cual resulta en que las microvellosidades envuelvan a la bacteria y se induce la producción de citocinas proinflamatorias. (Croxen et al., 2013) En esta inducción de citocina también se ha documentado que participa la flagelina de DAEC al unirse al receptor tipo Toll (TLR 5), que se encuentra en la cara basolateral de los enterocitos, induciendo la secreción de IL-8, lo que da como resultado la migración a través de la barrera epitelial de los polimorfonucleares, promoviendo de esta manera la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF- α) e IL-1 β por los enterocitos, lo que resulta en la acumulación de DAF sobre los enterocitos, estimulando que envuelva a DAEC de tal manera que esta

bacteria ya no queda expuesta al lumen intestinal. (Croxen et al., 2013; Meza-Segura & Estrada-Garcia, 2016)

***E. coli* enteroagregativa**

E. coli enteroagregativa (EAEC) tiene un mayor impacto en términos de morbilidad en niños menores de 5 años que viven en países en desarrollo y con problemas severos de desnutrición, así como también en infantes y adultos inmunocomprometidos especialmente infectados con VIH. (Gomes et al., 2016) EAEC es un patotipo definido por mostrar un patrón característico de adherencia agregativa (AA), el cual se caracteriza por la adherencia de las bacterias en una disposición de ladrillos apilados en la superficie de las células epiteliales HEP-2. (Asea et al., 2010)

La identificación de los factores de virulencia de EAEC proponer un modelo infección y acción que incluye tres etapas de patogénesis: (Estrada-Garcia et al., 2015; Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012; Gomes et al., 2016)

- Adherencia a la mucosa intestinal, para esto es esencial la contribución de adhesinas fimbriales y afimbriales, así como de otras proteínas de membrana con función adherente. En esta etapa hay un aumento en la secreción de moco en la mucosa intestinal que conduce a la formación de biopelículas en donde se adhieren las EAEC a los enterocitos.
- Producción de citotoxinas y enterotoxinas, que inducen al rearrreglo del citoesqueleto de las células epiteliales y la secreción de moco.
- Inducción de inflamación debido a la colonización de EAEC sobre la mucosa intestinal, la cual inicialmente depende del sistema inmune innato del hospedero y posteriormente como respuesta a las toxinas de EAEC. (Estrada-Garcia et al., 2015)

La EAEC se puede subdividir en típica y atípica basada en la presencia o ausencia del gen *aggR*, codificado en el plásmido pAA. El gen *aggR* codifica para un activador transcripcional llamado AggR, el cual se encarga de regular

alrededor de 44 genes de virulencia necesarios para inducir la enfermedad. (Estrada-Garcia et al., 2015; Gomes et al., 2016; Kaper et al., 2004; Kotloff et al., 2013)

Se induce la adherencia agregativa en células epiteliales mediante la fimbria de adhesión agregativa (AAF), la cual cuenta con 4 variantes diferentes, esta adherencia favorece la colonización intestinal y la formación de biopelículas sobre la superficie intestinal. (Gomes et al., 2016; Estrada-Garcia, 2015) Los genes que codifican las 4 variantes de AAF y que están codificados en el plásmido pAA son: *aggA* (AAF I), *aafA* (AAF II), *agg-3* (AAF III) y *agg4* (AAF IV o adhesina Hda). Cada aislado de EAEC lleva un solo subtipo de AAF, el responsable del fenotipo agregativo. (Asea et al., 2010; Farfán-García et al., 2016) Se ha observado que AAF II se une a los componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágeno tipo IV) de la mucosa intestinal confiriendo autoagregación. (Asea et al., 2010; Estrada-Garcia et al., 2015; Estrada-Garcia & Navarro-Garcia, 2012)

Se ha identificado que EAEC cuenta con un sistema de secreción tipo VI (T6SS), donde los grupos de genes responsables de este sistema de secreción (*sci-1* y *sci-2*) se encuentran en la isla de patogenicidad pheU regulada por AggR. (Aschtgen et al., 2008) De igual manera, en EAEC se han identificado el grupo de genes ETT2, lo cual indica la presencia de un sistema de secreción tipo III (T3SS). (Meza-Segura et al., 2020; Philipson et al., 2013)

La respuesta de células epiteliales infectadas por EAEC están mediadas por flagelina (*fliC*), la principal proteína del flagelo de EAEC, que al ser reconocida por los TLR 5, induce la activación de la proteína MAPK (mitogen-activated protein kinase) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) lo que induce la secreción tanto de IL-8, IL-6, TNF- α , GRO- α (growth-regulated oncogene), GRO- γ , ICAM – 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) e IL-1 α por las células epiteliales intestinales. (Asea et al., 2010)

***E. coli* Enteropatógena**

E. coli enteropatógeno (EPEC), es una bacteria del grupo de bacterias que se caracterizan por producir la denominada lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E), un fenotipo que lo confieren los genes codificados en el locus LEE (Locus of Enterocyte Effacement). (Croxen et al., 2013; Dean & Kenny, 2009) La lesión A/E se caracteriza por el esfacelamiento de las microvellosidades intestinales, el cual está acompañado por la formación de “pedestales” de actina por las células epiteliales exactamente por debajo de la bacteria adherida a la superficie del enterocito. (Croxen et al., 2013)

Las cepas de EPEC, se clasifican de acuerdo con sus características patogénicas en dos subtipos, los cuales son típicas (EPECt) o atípicas (EPECa), de acuerdo con la presencia o ausencia del plásmido del factor de adherencia de EPEC (pEAF), respectivamente. (Croxen et al., 2013) Donnenberg y Kaper describieron un modelo de patogénesis de EPEC basado en dos etapas:

- Adherencia, la unión inicial de EPECt a la superficie del epitelio intestinal esta mediada por los pilis BFP (Bundle-Forming Pilus), los cuales unen a las bacterias entre sí. Estas microcolonias de EPECt se unen al enterocito formando un patrón de adherencia localizada (LA), que pueden verse sobre la superficie de las células HEp-2. Por el contrario, las cepas EPECa que no cuentan con pilis BFP, por lo tanto, en muchas de estas cepas no se observan la formación de microcolonias y que pueden producir un patrón similar al de adherencia localizada (LAL), o inclusive difuso sobre células HEp-2. (Croxen et al., 2013)
- Transducción de señales, la unión de EPEC a las células intestinales inducen diversas vías de transducción de señales. Los genes necesarios para la transducción de señales y producción de la lesión A/E están codificados en LEE. LEE contiene los genes que codifican al

T3SS, adhesina intimina, la cual es una proteína de 94 kDa codificada por el gen *eae*, el receptor translocador de intimina (Tir) y diversas proteínas efectoras. (Croxen et al., 2013)

Cuando se activa T3SS y se produce el inyectosoma, Tir se transloca al citoplasma del enterocito donde se ancla a la membrana apical de éste, donde se lleva a cabo la unión de EPEC mediado por intimina. Al llevarse a cabo esta unión, Tir con intimina, se induce la fosforilación de la cola citoplasmática de Tir, promoviendo la activación y el reclutamiento de proteínas del enterocito (Nck, N-WASP y Arp 2/3), dichas proteínas inician la polimerización de actina para construir el “pedestal”. (Croxen et al., 2013; Janeway, 2001) Las proteínas efectoras codificadas por LEE, tales como EspF y EspG afectan la localización de las acuaporinas (canales transmembranales que transportan agua) y en conjunto con otros mecanismos provocan la diarrea característica de este patógeno. (Croxen et al., 2013)

JUSTIFICACIÓN

La desnutrición infantil continúa siendo un problema importante de salud pública en México y el mundo. Se ha demostrado un círculo vicioso entre la diarrea y la desnutrición. En México, el síndrome de diarrea es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años. En el estado de Yucatán, los PEDs son el principal grupo causal de diarrea, en niños (<5 años) que requieren hospitalización, por arriba de Rotavirus, *Salmonella* y *Shigella*. Los PEDs más prevalentes son DAEC, EAEC y EPECa. Se ha observado una disbiosis en el intestino de niños con diarrea por algunos PEDs, sin embargo, hasta el momento se desconoce la composición de la bacteriota de niños con diarrea por PEDs y desnutrición. La infección por EAEC y EPECt se han asociado con mayor frecuencia en niños que presentan desnutrición, pero aún se desconoce si la infección o la diarrea causada por DAEC y EPECa también se asocia con niños con desnutrición, así como la bacteriota intestinal de niños con DAEC, EPECt, EPECa y EAEC con diarrea y desnutrición. Por lo tanto, este trabajo permitirá identificar la prevalencia de niños con desnutrición hospitalizados por diarrea aguda, la asociación de estos 3 PEDs con la desnutrición e identificar los consorcios bacterianos intestinales en niños con diarrea por éstos PEDs con y sin desnutrición.

HIPÓTESIS

Los niños con diarrea causada por DAEC, EAEC y EPECa tienen una mayor incidencia de desnutrición.

La bacteriota de los niños con desnutrición y diarrea causada por DAEC, EAEC y EPECa es diferente a la de los niños sin desnutrición y con diarrea causada por estos patotipos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el estatus nutricional de los niños con diarrea aguda causada por PEDs, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* y *Campylobacter jejuni* que requirieron hospitalización y establecer la composición de la bacteriota intestinal de niños con diarrea causada por DEAEAC, EAEC y EPECa.

Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar el estatus nutricional de los niños menores de 5 años con diarrea causada por DAEC, EAEC, EPECa, ETEC, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* y *Campylobacter jejuni*.
- 2.- Caracterizar la bacteriota intestinal en pacientes con enfermedad diarreica causada por DAEC, EAEC y EPECa con y sin desnutrición.
- 3.- Determinar el efecto de la composición de la bacteriota en el perfil metabólico en pacientes con diarrea causada por DAEC, EAEC y EPECa con y sin desnutrición.

MATERIALES Y METODOS

Población de estudio

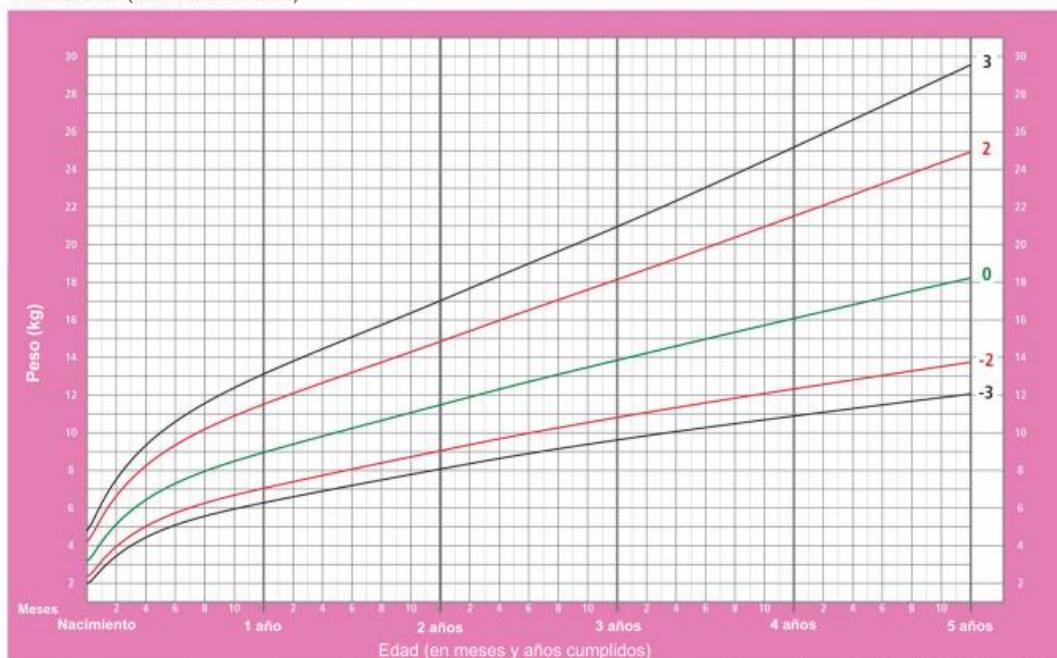
Se contó con un total de 1043 niños con diarrea aguda menores de 5 años que requirieron hospitalización en el Hospital General O'Horán, Mérida, y en el Hospital de Valladolid, Valladolid, ambos en Yucatán, que formaron parte del estudio de la búsqueda de biomarcadores financiado por NIH, que se realizó durante el periodo de diciembre 2010 a junio 2014.

Determinación del estatus nutricional de los niños

Se obtuvieron los datos antropométricos (peso y talla), edad y género de 214 niños menores de 5 años, con diarrea aguda causada por DAEC, EAEC, EPEC, ETEC, *Shigella flexneri*, *Salmonella entérica* y *Campylobacter jejuni*, como patógenos únicos. A partir de estas mediciones, se determinó el estatus nutricional, usando la norma de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para el diagnóstico nutricional, se calcularon los índices transformados en puntaje Z de talla para la edad, peso para la talla, y peso para la edad **Figura 6**. Se determinó desnutrición aguda cuando el puntaje Z de peso para la edad y en peso para la talla se encuentra por debajo de -2, y en desnutrición crónica cuando el puntaje Z de talla para la edad, está por debajo de -2. (Cuevas-Nasu et al., 2019)

Peso para la edad Niñas

Puntuación Z (Nacimiento a 5 años)



Patrones de crecimiento infantil de la OMS

Figura 6. Gráfica de patrones de crecimiento de la OMS en puntuación Z. Gráfica para evaluar el estatus nutricional de las niñas de entre 0 y 5 años, en esta gráfica se relaciona la edad y el peso de las niñas. Un puntaje Z menor a -2 indica un problema de desnutrición aguda.

Población de estudio para determinación de la bacteriota

La caracterización de las poblaciones bacterianas se realizó en 72 muestras de heces diarreicas: 30 con DAEC, 25 con EAEC y 17 con EPECa, todas como muestras de patotipo único.

Se tomaron 200 mg de las muestras congeladas de heces de los pacientes seleccionados, después se procedió a realizar la extracción de DNA empleando el kit QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor. El DNA se recuperó en un volumen final de 200 μ L de Buffer AE (Qiagen).

Precipitación de DNA en fenol cloroformo

La purificación del DNA se realizó mediante el método de fenol cloroformo y ciclos de centrifugación. En una primera etapa, a la muestra obtenida de la extracción del DNA se agregó fenol-cloroformo, se homogeneizó y se centrifugó, formándose así dos fases: una fase acuosa formada por el DNA y una fase orgánica, constituida por residuos de proteínas o lípidos. Una vez recuperada la fase acuosa, se adicionó etanol absoluto y acetato de sodio para precipitar el DNA. Esta mezcla, reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y así producir el plegamiento del DNA sobre sí mismo haciéndose insoluble. A continuación, se homogeneizó suavemente y se centrifugó durante 15 minutos. Posteriormente, se decantó cuidadosamente y se eliminó los residuos de alcohol con un lavado con etanol al 70%. Por último, cada una de las muestras se resuspendió en agua inyectable y se determinó su concentración y pureza con un NanoDrop 2000.

Prueba de amplificación del DNA

Mediante PCR de punto final, se evaluó la adecuada purificación del DNA de cada una de las muestras. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 15 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 60°C, 15 minutos a 75°C; y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Cada reacción contenía 1 µL de DNA, 1 µL de MgCl₂, 2.5 µL de dNTPs, 0.4 µL del set de primers (forward GGTCCGGCCGGGAATC, reverse CGCTTGCTCTCGCGAGGT CGC), 17.4 µL de H₂O inyectable, 2.5 µL de Buffer 10X y 0.2 µL de la enzima Taq. Como control negativo se utilizó agua inyectable y como control positivo DNA extraído de una colonia aislada de 042 EAEC. Posteriormente, 10 µL de cada producto de amplificación se mezcló con 2 µL de buffer de carga. Las mezclas se cargaron en un gel de agarosa al 2% junto con 1 µL del marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen) y se sometieron a electroforesis a 80V durante 60 minutos. Finalmente, el gel se sumergió durante 5 minutos en una solución de bromuro de etidio al 10%, y se

reveló en un transiluminador de luz ultravioleta. Finalmente, se observó la presencia del DNA amplificado.

Construcción de las bibliotecas y la secuenciación del gen 16S rRNA

La construcción de las bibliotecas y de la demultiplexación se realizó en la unidad Langebio del CINVESTAV, empleando la plataforma MiSeq® de Illumina® y primers universales (forward TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG y reverse GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCCGATCTAATCC), dirigidos para la amplificación de las regiones polimórficas V3 a V5 del gen de rRNA 16S.

Brevemente la construcción de las bibliotecas consiste en agregar secuencias del DNA cortas, denominadas índices, a cada fragmento del DNA mediante el cual se identifica a que muestra corresponde cada DNA. La secuenciación de las bibliotecas del DNA consiste en determinar la secuencia de bases de los nucleótidos (A, T, C, G) de cada fragmento contenido en las bibliotecas.

Análisis bioinformático

Las secuencias generadas por Miseq se analizaron por la plataforma “Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2” (QIIME). Las secuencias de todas las muestras se importaron utilizando el formato Casava 1.8 demultiplexado. El proceso para el filtrado de calidad de las secuencias importadas se realizó por medio de la herramienta Deblur, en la cual se asocian lecturas de secuencias erróneas con las verdaderas secuencias biológicas de la que se derivan, lo que da como resultado, variantes de secuencias de alta calidad con un corte establecido de 240 pb. Como resultado de este paso, se obtuvieron secuencias representativas de alta calidad, las cuales se alinearon con la base de datos de SILVA 132nb para la asignación taxonómica.

La composición taxonómica del bacterioma intestinal se evaluó mediante RStudio. La diversidad α (Shannon y OTUs observados) se obtuvo mediante el paquete Microbiome. La diversidad beta, se calculó utilizando el índice de Bray-Curtis considerando un filtro del 30% de presencia de los OTUs y se representó en un gráfico de escala no métrica multidimensional (NMDS).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la plataforma de R, en su interfaz de RStudio con los paquetes Microbiome, Stats, PairwiseAdonis2 y Vegan. Se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro–Wilk. Para detectar diferencias significativas entre las abundancias relativas de los OTUs y la diversidad alfa entre las diferentes condiciones, se utilizó la prueba de t-Student, U Mann-Whitney o Wilcoxon, según correspondiera. Las estructuras taxonómicas en las diferentes condiciones se analizaron (desnutrición y sin desnutrición) mediante PERMANOVA (Análisis de Varianza Multivariado Permutacional). Los valores de p se ajustaron mediante False Discovery Rate (por sus siglas en inglés FDR). De igual manera se utilizó el software GraphPad PRISM® 5.0, empleando la prueba exacta de Fisher (FET) y la razón de momios (OR). Los valores de $p < 0.05$ se consideran significativos. Los gráficos de abundancia y de diversidad se generaron utilizando el paquete ggplot2.

Se realizó un “Linear discriminant analysis” (LDA) (LEfSe) en Galaxy/Hutlab (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) por medio del cual se detectaron posibles biomarcadores bacterianos diferentes entre las condiciones evaluadas (desnutrición y sin desnutrición) se utilizó una puntuación LDA mayor a 2.

Análisis de las rutas metabólicas

Se realizó mediante PICRUSt2 que se utiliza para predecir las vías metabólicas utilizando los perfiles de secuenciación del gen marcador

16S rRNA. Las predicciones de PICRUST2 están basadas en varias bases de datos de genes, incluida la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG). (Douglas et al., 2020) En este estudio, los perfiles funcionales de las comunidades bacterianas se predijeron utilizando las vías KEGG. La precisión de las predicciones se evaluó mediante el cálculo del índice de taxón secuenciado más cercano (NSTI). Para el análisis estadístico de la función bacteriana se utilizó el programa STAMP y la prueba de Welch que compara las muestras. Los datos se expresaron con desviación estándar y una significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Incidencia de desnutrición en niños menores de 5 años con diarrea aguda causada por un solo patógeno

De los 1043 con diarrea aguda que requirieron hospitalización en Mérida Yucatán, se identificaron 214 niños a los que se les aisló solo un patógeno como agente causal de diarrea: 109 pacientes con PEDs, 45 con DAEC, 32 con EAEC, 22 con EPECa y 10 con ETEC, así como 105 pacientes con otros patógenos entéricos, 40 con *Salmonella enterica*, 34 con *Shigella flexneri*, 9 con *Shigella sonnei*, 19 con *Campylobacter jejuni* y 3 con *Campylobacter coli*. Como se muestra en la **Tabla 1** se realizó el análisis del estatus nutricional con base en las puntuaciones Z de la OMS (**Figura 6**, material y métodos). De los 109 pacientes con PEDs, 64 tuvieron desnutrición (58.8%) y de los 105 pacientes con otros patógenos entéricos, 46 (43.8%), por lo tanto, la incidencia de desnutrición en pacientes con PEDs fue significativamente mayor ($p < 0.05$ FET, OR 2.046) al número de pacientes con diarrea causada por otras bacterias. De los 64 pacientes con PEDs y con desnutrición se identificaron a 36 (33.2%) con desnutrición crónica, lo cual fue significativamente mayor ($p < 0.05$ FET, OR 2.141) al número de pacientes con desnutrición crónica 21 (20%) y diarrea por otros patógenos. Mientras que, no se observó diferencias significativas entre los niños con diarrea por PEDs y desnutrición aguda y diarrea por otros patógenos.

Tabla 1. Estado nutricional de los niños menores de 5 años con diarrea aguda causada por un patógeno único.

	DESNUTRICIÓN			SIN DESNUTRICIÓN	TOTAL
	CRÓNICA	AGUDA	TOTAL		
PED	36 (33.2%) ^b	28 (25.6%)	64 (58.8%) ^a	45 (41.2%)	109

OTROS PATOGENOS	21 (20%)	25 (23.8%)	46 (43.8%)	59 (56.2%)	105
----------------------------	----------	---------------	------------	------------	-----

^a PEDs con desnutrición vs Otros patógenos con desnutrición $p < 0.05$, razón de momios 2.046

^b PEDs con desnutrición crónica vs Otros patógenos con desnutrición crónica $p < 0.05$, razón de momios 2.141

Al comparar el estatus nutricional de los niños con diarrea por DAEC, EAEC y EPECa no se observó diferencias significativas en el número de niños con desnutrición por patotipo. **Tabla 2.** Mientras que se observó que el número de niños con desnutrición infectados con DAEC era significativamente mayor con respecto al número de niños con desnutrición con diarrea por *Shigella spp* ($p < 0.05$ FET, OR 3.477) y *Campylobacter spp* ($p < 0.05$ FET, OR 12.38). De igual manera, el número de niños con desnutrición crónica o desnutrición aguda infectados con DAEC fue significativamente mayor con respecto al número de niños con desnutrición crónica o desnutrición aguda con *Campylobacter spp* ($p < 0.05$ FET, OR 5.517 y $p < 0.05$, OR 6.07, respectivamente) y para los niños con desnutrición y con EAEC ($p < 0.05$ FET, OR 4.5) y con EPECa ($p < 0.05$ FET, OR 6.5) solo con *Campylobacter spp*.

Tabla 2. Estado nutricional de los niños menores de 5 años con diarrea aguda causada por un patógeno único.

	DESNUTRICIÓN			SIN DESNUTRICIÓN	TOTAL
	CRÓNICA	AGUDA	TOTAL		
DAEC	14 (31.1%) ^c	16 (35.5%) ^d	30 (66.6%) ^{a,b}	15 (33.4%)	45

EAEC	11 (34.3%)	5 (15.7 %)	16 (50%) ^e	16 (50%)	32
EPECa	7 (31.8%)	6 (27.3%)	13 (59.1%) ^f	9 (40.9%)	22
ETEC	4 (40%)	1 (10%)	5 (50%)	5 (50%)	10
<i>Shigella spp.</i>	9 (20.9%)	10 (23.2%)	19 (44.1%)	24 (55.9%)	43
<i>Salmonella enterica</i>	10 (25%)	13 (32.5%)	23 (57.5%)	17 (42.5%)	40
<i>Campylobacter spp.</i>	2 (9%)	2 (9%)	4 (18%)	18 (82%)	22

^a DAEC con desnutrición vs *Shigella spp* con desnutrición $p < 0.05$, razón de momios 3.474

^b DAEC con desnutrición vs *Campylobacter spp* con desnutrición $p < 0.05$, razón de momios 12.38

^c DAEC con desnutrición crónica vs *Campylobacter spp* con desnutrición crónica $p < 0.05$, razón de momios 5.517

^d DAEC con desnutrición aguda vs *Campylobacter spp* con desnutrición aguda $p < 0.05$, razón de momios 6.071

^e EAEC con desnutrición vs *Campylobacter spp* con desnutrición $p < 0.05$, razón de momios 4.5

^f EPECa con desnutrición vs *Campylobacter spp* con desnutrición $p < 0.05$, razón de momios 6.5

Características de la población de niños con diarrea causada por PEDs como patógenos únicos a los que se le caracterizó la bacteriota por la técnica del 16rRNA

De las 109 muestras de heces de pacientes con PEDS como patógeno único se caracterizó la bacteriota de las heces de 72 niños (30 DAEC, 25 EAEC y 17 EPECa) Todos estos pacientes eran menores de 3 años, 38 niños habían sido destetados y estaban ablactados, 27 niños lactados al pecho y ablactados y solo 7 niños recibían lactancia exclusiva. Además 32 de estos niños habían recibido antibiótico antes de la hospitalización. De las 30 muestras de pacientes con DAEC, de las 25 de EAEC y de las 17 de EPECa se diagnosticaron 15, 12 y 8 niños con desnutrición, respectivamente.

Análisis comparativo de las abundancias relativas de los OTUs a diferentes niveles taxonómicos entre pacientes con DAEC con y sin desnutrición

Como se muestra en la **Figura 7**, las familias Prevotellaceae y Veillonellaceae, así como el género *Prevotella* 9, fueron significativamente más prevalentes en los niños con diarrea por DAEC y desnutrición en comparación con los niños sin desnutrición. Al analizar las abundancias relativas de los OTUs por familia y género <1% (clasificado como “otros” en ambos gráficos) se identificó que la familia Pseudomonadaceae y los géneros *Alloprevotella*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* presentaban una mayor abundancia relativa en la bacteriota de los niños con desnutrición ($p < 0.05$ WMW) vs sin desnutrición.

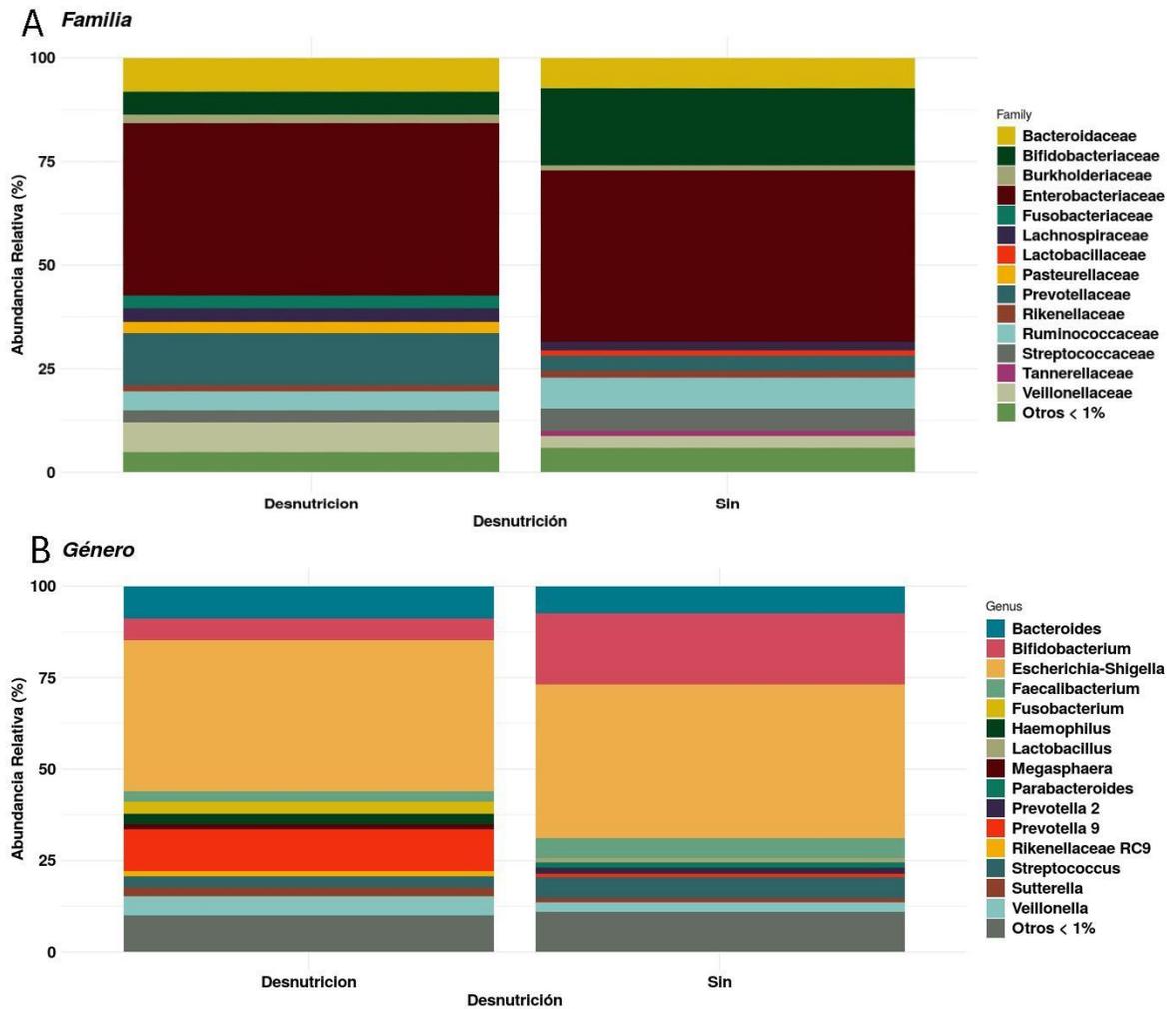


Figura 7. Abundancia relativa de los OTUs identificados en las muestras con DAEC provenientes de niños con y sin desnutrición. Las gráficas se obtuvieron por RStudio haciendo uso de las paqueterías. Los gráficos de barra muestran la proporción relativa en porcentajes de cada OTU detectado por el análisis. A) Abundancia relativa a nivel de familia. Las familias Prevotellaceae y Veillonellaceae fueron significativamente más abundantes ($p < 0.05$ WMW) en los niños con desnutrición. B) Abundancia relativa a nivel de género. El género *Prevotella 9* fue significativamente más abundante ($p < 0.05$ WMW) en los niños con desnutrición.

Análisis comparativo de las abundancias relativas de los OTUs a diferentes niveles taxonómicos entre pacientes con EAEC con y sin desnutrición

Como se observa en la **Figura 8**, el phylum Epsilonbacteraeota, la familia Veillonellaceae y el género *Veillonella*, fueron significativamente más abundantes en niños con diarrea por EAEC y desnutrición comparados con los niños sin desnutrición. Al analizar las abundancias relativas de los OTUs por phylum, familia y género <1% (clasificado como “otros” en los gráficos) se identificó que los géneros *Actinobacillus*, *Dialister* y *Paraprevotella* presentaban una mayor abundancia relativa en la bacteriota de los niños con desnutrición ($p < 0.05$ WMW) vs sin desnutrición.

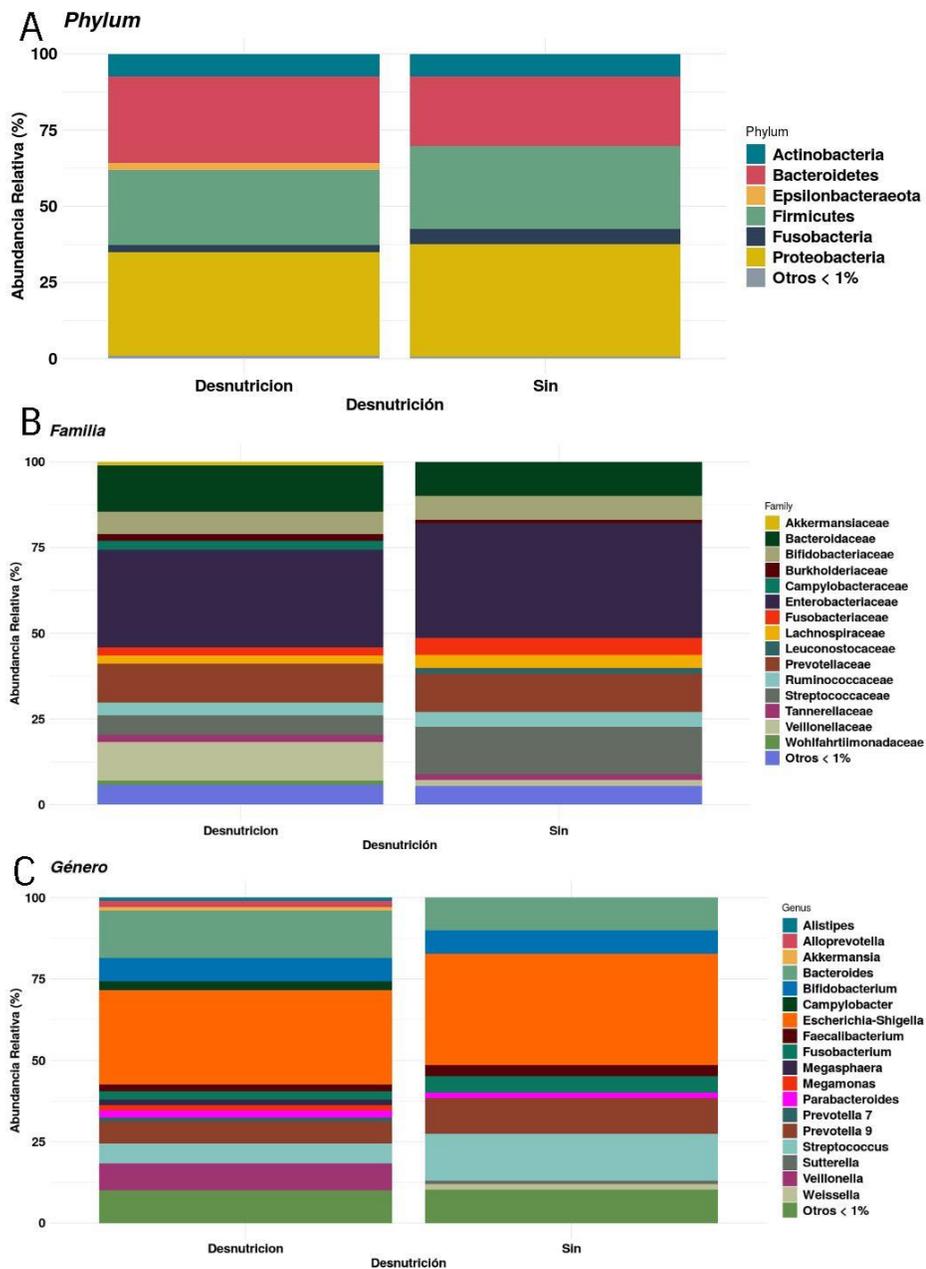


Figura 8. Abundancia relativa de los OTUs identificados en las muestras con EAEC proveniente de niños con y sin desnutrición. Las gráficas se obtuvieron por RStudio haciendo uso de las paqueterías. Los gráficos de barra muestran la proporción relativa de cada OTU detectado por el análisis. A) Abundancia relativa a nivel de phylum. El phylum Epsilonbacteraeota fue significativamente más abundante ($p < 0.05$ WMW) en los niños con desnutrición. B) Abundancia relativa a nivel de familia. La familia Veillonellaceae fue significativamente más

abundante ($p < 0.05$ WMW) en los niños con desnutrición. C) Abundancia relativa a nivel de género. El género *Veillonella* fue significativamente más abundante ($p < 0.05$ WMW) en los niños con desnutrición.

Análisis comparativo de las abundancias relativas de los OTUs a diferentes niveles taxonómicos entre pacientes con EPECa con y sin desnutrición.

Como se muestra en la **Figura 9**, las familias Burkholderiaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae y los géneros *Faecalibacterium* y *Bacteroides*, fueron significativamente más prevalentes en niños con diarrea por EPECa sin desnutrición en comparación con los niños con desnutrición. Analizando las abundancias relativas de los OTUs por familia y género $< 1\%$ (clasificado como “otros” en ambos gráficos) se identificó a la familia Burkholderiaceae y a los géneros *Flavonifractor*, *Anaerotruncus*, *Sutterella*, *Ruminiclostridium 9*, *Ruminiclostridium 5* y *Blautia* presentaban una mayor abundancia relativa en la bacteriota de los niños sin desnutrición ($p < 0.05$ WMW) vs con desnutrición.

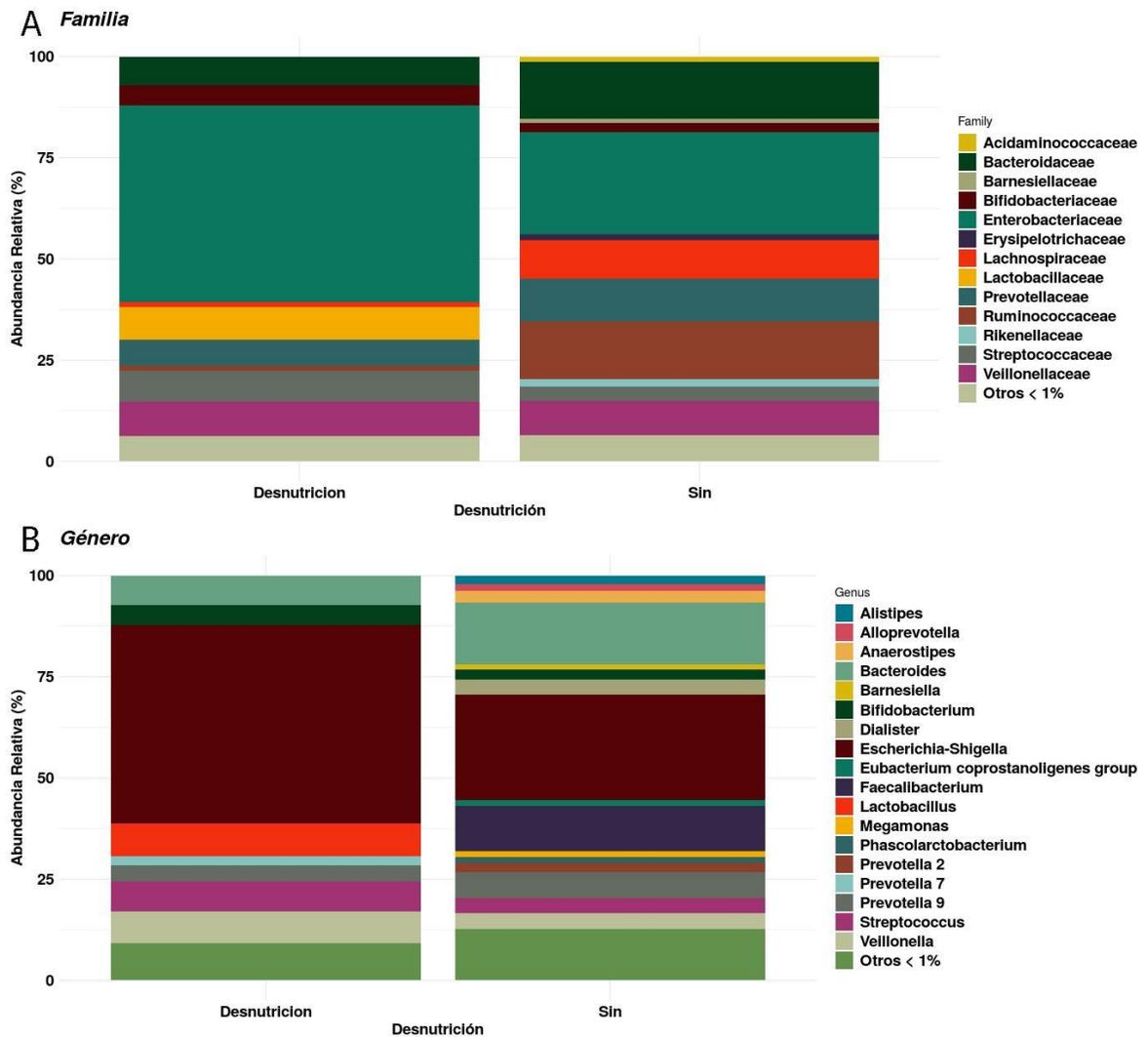


Figura 9. Abundancia relativa de los OTUs identificados en las muestras con EPECa provenientes de niños con y sin desnutrición. Las gráficas se obtuvieron por RStudio haciendo uso de las paqueterías. Los gráficos de barra muestran la proporción relativa de cada OTU detectado por el análisis. A) Abundancia relativa a nivel de familia. Las familias Lachnospiraceae y Ruminococcaceae fueron significativamente más abundantes ($p < 0.05$ WMW) en los niños sin desnutrición. B) Abundancia relativa a nivel de género. Los géneros *Faecalibacterium* y *Bacteroides* fueron significativamente más abundantes ($p < 0.05$ WMW) en los niños sin desnutrición.

Análisis de ausencia y presencia de OTUs en las muestras de niños con diarrea aguda por PEDs con y sin desnutrición.

En el análisis de ausencia y presencia se detectó el número de OTUs presentes en las muestras de los niños con PEDs. En total se identificaron 220 OTUs, de los cuales, 148, 136 y 126 se encontraron en los niños con desnutrición y con diarrea por DAEC, EAEC y EPECa, respectivamente. Por otro lado, en los niños sin desnutrición y con diarrea por DAEC, EAEC y EPECa se encontraron 152, 141 y 148 OTUs, respectivamente.

Comparación del índice de diversidad α de los OTUS identificados en los pacientes con PEDS con y sin desnutrición.

La diversidad α establece la riqueza y la abundancia de los OTUs dentro de un grupo de muestras, esto se realizó utilizando tanto el recuento de OTUS observados, como el índice de diversidad de Shannon. Como se observa en la **Figura 10**, hay tendencias en la riqueza entre patotipos y grupos (desnutrición y sin desnutrición), pero estas no fueron significativas.

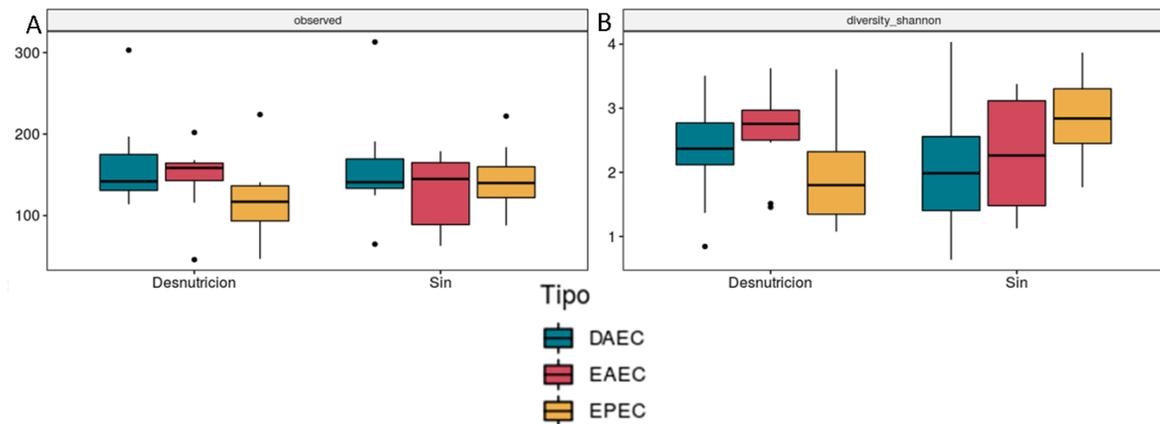
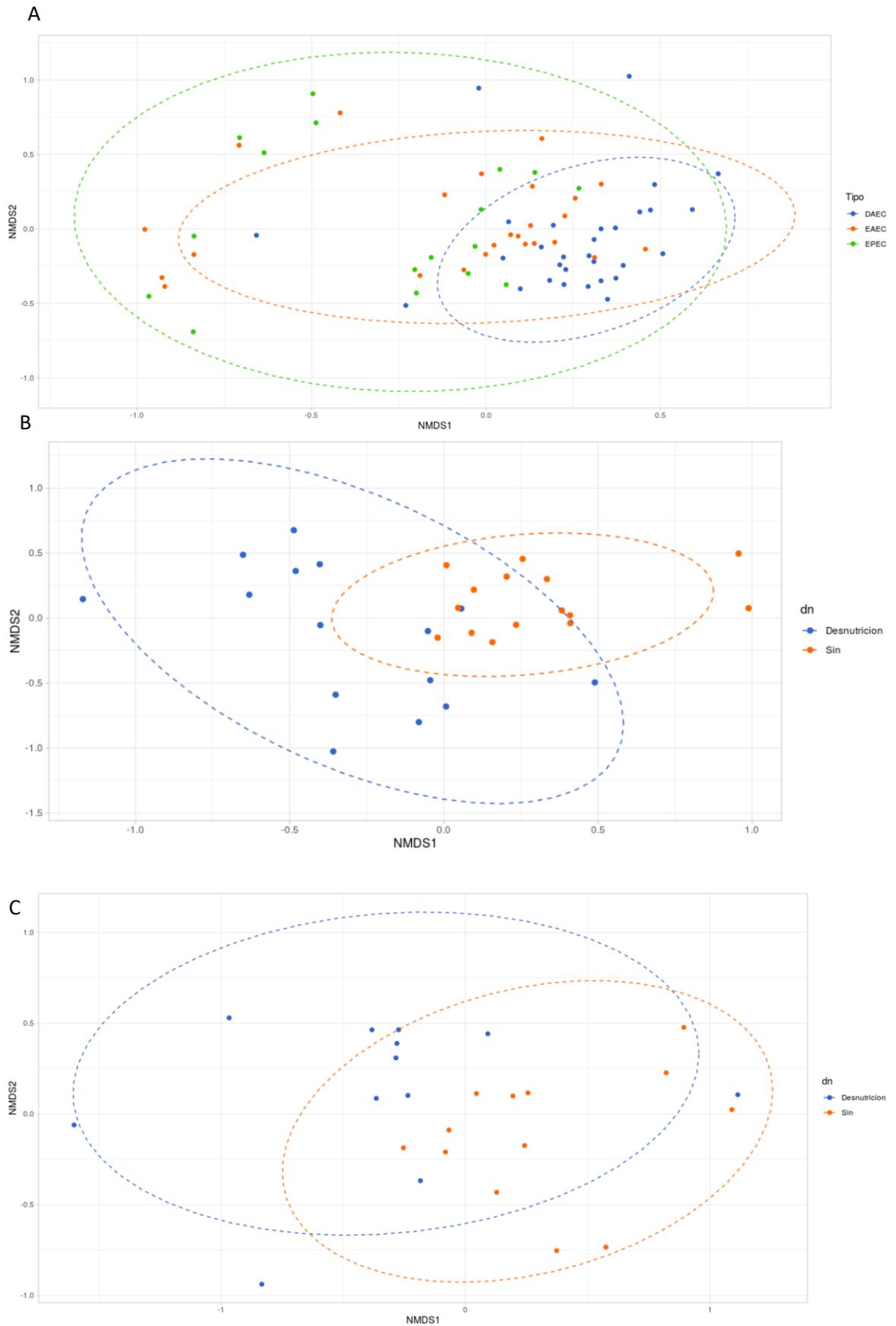


Figura 10. Índices de diversidad α de las muestras de niños con DAEC, EAEC y EPECa con y sin desnutrición. Las gráficas se obtuvieron por RStudio haciendo uso de las paqueterías. A) Diagramas de cajas y bigotes para la comparación de la diversidad de especies (OTUs observados) entre los tres PEDs y las condiciones analizadas (desnutrición vs. sin desnutrición). B)

Diagramas de cajas y bigotes para la comparación de la diversidad de especies (índice de diversidad de Shannon) entre los tres PEDs de estudio y las condiciones analizadas. No se observaron diferencias significativas entre ninguna de las comparaciones.

Comparación del índice de diversidad β de los OTUS identificados en los pacientes con PEDS con y sin desnutrición, por el índice de Bray-Curtis

La diversidad β evalúa la disimilitud de los OTUs que conforman la bacteriota. Los OTUS que contienen las heces de los pacientes con cada patotipo son significativamente diferentes entre ellos ($p < 0.05$, PERMANOVA). **Figura 11 A** Además, se observó que también los OTUs presentes en la bacteriota de los pacientes con desnutrición son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$, PERMANOVA) con respecto a los de los pacientes sin desnutrición entre los tres PEDs. **Figura 11 B, C y D**



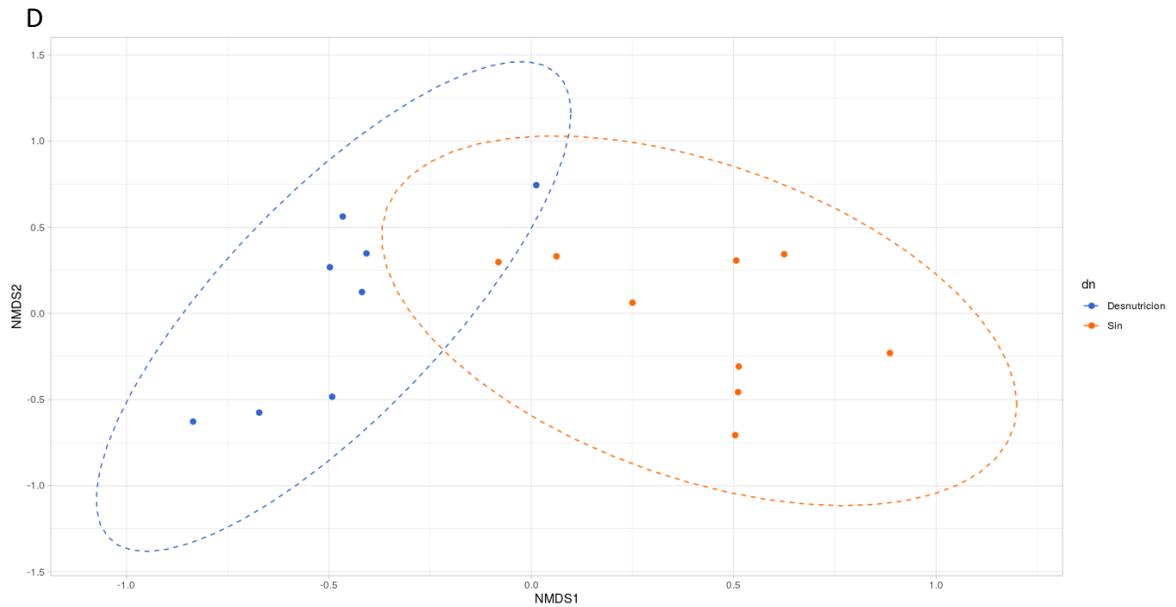


Figura 11. Diversidad β de las muestras de los niños con DAEC, EAEC y EPECa con y sin desnutrición. A) NMDS de las muestras con DAEC, EAEC y EPECa los puntos muestran la posición de cada muestra evaluada en un espacio de dos dimensiones manteniendo las distancias como reflejo de la disimilitud, las elipses engloban el mayor número de las muestras. B) NMDS de las muestras con DAEC con y sin desnutrición. C) NMDS de las muestras con EAEC con y sin desnutrición. D) NMDS de las muestras con EPECa con y sin desnutrición. En todos los casos se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, PERMANOVA).

Identificación en el bacterioma de los pacientes con y sin desnutrición de posibles biomarcadores bacterianos

Mediante el algoritmo de LEfSe se identificaron los OTUs enriquecidos en los pacientes con diarrea aguda por PEDs y con desnutrición. Como se muestra en la **Figura 12**, la clase Negativicutes, el orden de Selenomonadales y la familia Veillonellaceae, estaban sobrerrepresentadas (puntuación LDA ≥ 4), mientras que no se reportó algún OTU representativo en los pacientes con diarrea y sin desnutrición.



Figura 12. Identificación de posibles biomarcadores bacterianos en las muestras de niños con DAEC, EAEC y EPECa y con desnutrición. OTUs bacterianos representados diferencialmente en la condición de desnutrición identificados por el LDA (LEfSe). Solo se muestran los OTUs con una puntuación de LDA de al menos 4.

El efecto de la composición de la bacteriota en el perfil metabólico de los pacientes con diarrea causada por DAEC con desnutrición vs. sin desnutrición.

Al comparar las muestras provenientes de niños con diarrea causada por DAEC con y sin desnutrición se encontró que algunas funciones bacterianas como la biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS), fenilalanina, tirosina y triptófano y las vías de fijación de carbono se encontraban enriquecidas significativamente en las muestras de los niños con desnutrición. **Figura 13** Mientras que, en los niños sin desnutrición, se observaron enriquecidas las vías metabólicas del propionato, piruvato y la de la glucólisis.

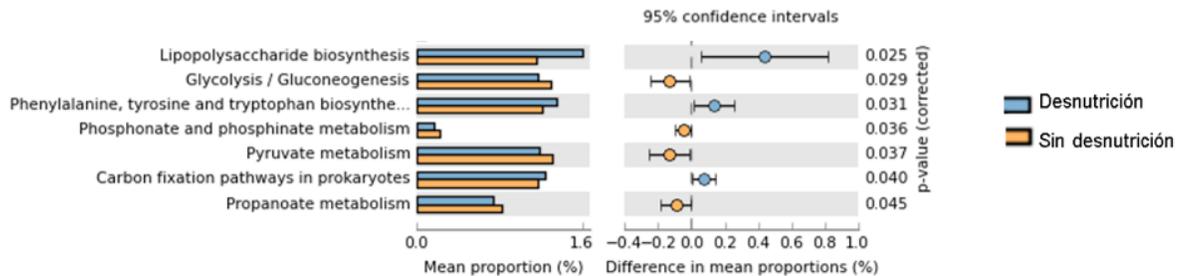


Figura 13. El gráfico de barra de error extendida muestra las funciones metabólicas putativas que se encuentran enriquecidas en las heces de los pacientes con DAEC, con y sin desnutrición, el cual se determinó mediante PICRUS2. En el eje de las ordenadas se representan las 7 funciones metabólicas identificadas por KEGG ($p < 0.05$), mientras que, el gráfico de la derecha los puntos representan las medias de los porcentajes y sus intervalos de confianza al 95% calculado por la prueba de Welch y sobre el eje de la izquierda los valores de p significativos.

El efecto de la composición de la bacteriota en el perfil metabólico de los pacientes con diarrea causada por EAEC con desnutrición vs. sin desnutrición.

Las funciones metabólicas bacterianas enriquecidas en los pacientes con EAEC y desnutrición fueron la degradación de tolueno, el metabolismo del propionato y el metabolismo de la D-arginina y la D-ornitina. **Figura 14** Mientras que, la biosíntesis de estreptomycin, las interconversiones de pentosa y del glucuronato así como, el metabolismo del inositol fosfato, el ácido lipóico, la galactosa, el almidón y la sacarosa se encontraron enriquecidos significativamente en las muestras de los niños sin desnutrición.

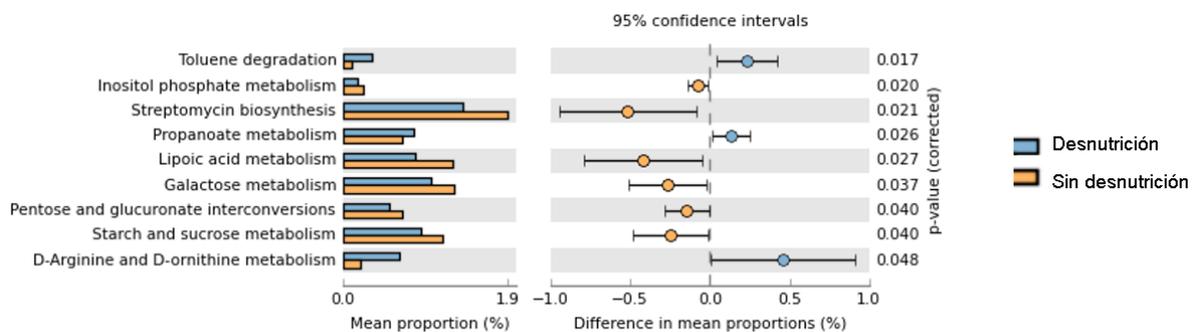


Figura 14. El gráfico de barra de error extendida muestra las funciones metabólicas putativas que se encuentran enriquecidas en las heces de los pacientes con EAEC, con y sin desnutrición, el cual se determinó mediante

PICRUSt2. En el eje de las ordenadas se representan las 9 funciones metabólicas identificadas por KEGG ($p < 0.05$), mientras que, el grafico de la derecha los puntos representan las medias de los porcentajes y sus intervalos de confianza al 95% calculado por la prueba de Welch y sobre el eje de la izquierda los valores de p significativos.

El efecto de la composición de la bacteriota en el perfil metabólico de los pacientes con diarrea causada por EPECa con desnutrición vs. sin desnutrición.

En los pacientes con EPECa y desnutrición a pesar de que no se observó en el análisis de abundancia relativa algún OTU representativo, su bacteriota presento vías metabólicas representativas como el metabolismo de los glicerolípidos, la alanina y la tiamina, la degradación de la dioxina, la valina, la leucina y la isoleucina, así como, la síntesis y degradación de cuerpos cetónicos. **Figura 15** Por otro lado, el metabolismo de la D-alanina, del aspartato, del glutamato, del metano, del sulfuro, de la vitamina B6, del almidón, de la sacarosa, del nicotinato y de la nicotinamida, la fosforilación oxidativa, vía de señalización de receptores tipo NOD, la apoptosis y los peroxisomas se enriquecieron significativamente en las muestras de niños sin desnutrición.

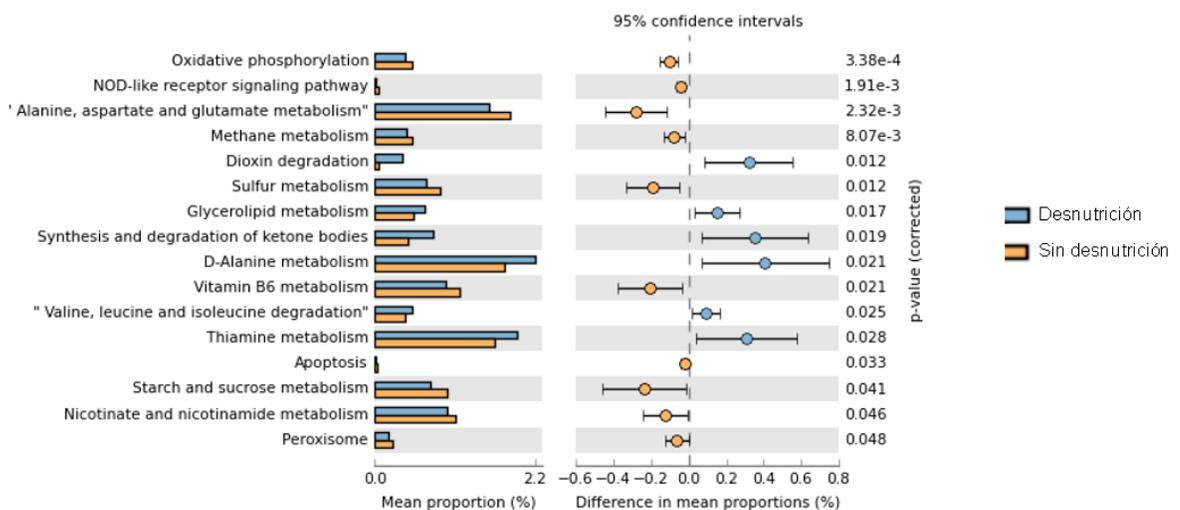


Figura 15. El gráfico de barra de error extendida muestra las funciones metabólicas putativas que se encuentran enriquecidas en las heces de los pacientes con EPECa, con y sin desnutrición, el cual se determinó mediante PICRUSt2. En el eje de las ordenadas se representan las 16 vías identificadas por KEGG ($p < 0.05$), mientras que, el grafico de la derecha los puntos representan las medias de los porcentajes y sus intervalos de confianza al 95% calculado por la prueba de Welch y sobre el eje de las ordenadas a la izquierda los valores de p significativos.

DISCUSIÓN

La parte inicial de este proyecto consistió en analizar la incidencia de desnutrición en niños con diarrea aguda causada por diferentes enteropatógenos intestinales, cuyos cuadros fueron lo suficientemente severos como para acudir al hospital. De los 214 niños con diarrea incluidos en el estudio que presentaban como patógeno único PEDs, *Shigella spp*, *Salmonella enterica* y *Campylobacter spp*, 110 (51.4%) fueron diagnosticados con desnutrición de acuerdo con las puntuaciones Z de la OMS (World Health Organization, 2021), 57 con desnutrición crónica y 53 con desnutrición aguda. De manera similar, se reportó en un estudio realizado en 2018 en niños con diarrea de Etiopia una prevalencia de desnutrición del 42%, desnutrición crónica del 36.6% y desnutrición aguda del 5.4%. (Gebreyesus Wasihun et al., 2018). La asociación entre diarrea y la desnutrición (circulo vicioso) en niños se ha reportado en varios países, por ejemplo, en niños peruanos se asoció la incidencia de diarrea significativamente con desnutrición, observando que la frecuencia de diarrea incremento un 15% en este grupo comparado con los niños sin desnutrición. (Checkley et al., 2002) Por lo tanto, numerosos episodios de diarrea en los primeros años de vida (< 5) reduce la capacidad de recuperación de peso y talla. (Guerrant et al., 1992). Por otro lado, la desnutrición infantil incrementa la probabilidad de que los niños presenten episodios de diarrea hasta en un 37% así como aumenta la duración del episodio diarreico hasta en un 73% de acuerdo con estudios realizados en el norte de Brasil. (Guerrant et al., 1992)

Este estudio realizado entre el 2010 y 2014 en Mérida y en Valladolid, sigue mostrando que, en regiones menos desarrolladas del mundo, la diarrea y la desnutrición son un problema de salud pública importante. Se ha demostrado que los niños con desnutrición presentan una mayor morbilidad y mortalidad de enfermedades diarreicas y de infecciones de vías respiratorias que los niños sin desnutrición. (Checkley et al., 2002) Por lo que, los niños menores

de 5 años deben de considerarse en alto riesgo de presentar mayores tasas de prevalencia de desnutrición crónica en Yucatán, ya que su prevalencia (15.8%) es superior al promedio de la reportada para el resto del país (13.6%). (ENSANUT, 2012). Además, los municipios de Mérida y Valladolid son de los municipios que presentan una alta incidencia de pobreza en México del 29.4% y 64.4%, respectivamente. (CONEVAL, 2010) También, en este reporte se mostró que Yucatán presenta un alto porcentaje de hogares con inseguridad alimentaria (70%) por arriba nuevamente de la prevalencia nacional (55.5%), además en Yucatán se ha reportado que la cantidad y la variedad de los alimentos es poca. (Arellano, 2019; CONEVAL, 2021; Gutiérrez Carbajal et al., 2019)

Los enteropatógenos representan una exposición ambiental común en las primeras etapas de la vida. El periodo de exposición a los enteropatógenos se incrementa en personas que viven en condiciones insalubres, donde el saneamiento del ambiente es deficiente y la carga de enteropatógenos es alta, siendo esto un factor clave que determina la prevalencia de la diarrea y la desnutrición infantil en estas regiones. (Blanton et al., 2016). En el presente estudio la diarrea causada por EAEC se asoció de manera significativa con niños que presentaban desnutrición (50% de los casos) al compararse con los niños con diarrea por *Campylobacter spp* (18% de los casos) parecido a lo que ya se ha reportado previamente en niños con diarrea por EAEC y desnutrición de Ghana y Perú. (Acosta et al., 2016; Opintan et al., 2010) Sin embargo, hasta el momento no se había reportado que la diarrea causada por DAEC también fuera más prevalente en niños con desnutrición (66.6%) como lo reportamos en este estudio. Mientras que con EPEC y ETEC la distribución fue similar entre los grupos de pacientes con y sin desnutrición. Los pacientes con diarrea por *Salmonella* entérica mostraron una prevalencia de desnutrición del 57.5%, para *Shigella spp* del (50%) similar a lo reportado en niños de Kenia (Subramanian et al., 2014) y para *Campylobacter spp* fue tan solo de 18%.

Hasta el momento se han realizado muy pocos estudios de la microbiota de niños con diarrea y aun menos de niños con diarrea causada por PEDs. (Gallardo et al., 2017; Mathew et al., 2019; Peña-Gonzalez et al., 2019) En años recientes el estudio de la microbiota intestinal en poblaciones sanas o con enfermedades ha tomado gran relevancia, y se ha demostrado que esta microbiota puede interactuar favorablemente sobre las células del hospedero, lo que conlleva a un estado homeostático saludable, o puede interactuar negativamente contribuyendo a una condición de disbiosis. (Garcia-Montero et al., 2021) Esta disbiosis se clasifican en taxonómica y metabólica, en el presente estudio caracterizamos ambas disbiosis en las heces de 72 pacientes con diarrea por DAEC, EAEC y EPECa con y sin desnutrición. En el análisis de abundancia relativa de las muestras de heces de pacientes con DAEC y EAEC con desnutrición, se observó un incremento estadístico de ciertos OTUs vs. las heces de los pacientes sin desnutrición. En las heces de los pacientes con DAEC las familias Prevotellaceae y Veillonellaceae y el género *Prevotella* 9 fueron los más abundantes, este género también fue más prevalente en las heces de niños de Qatar con infecciones mixtas de diarrea por rotavirus con EPEC o EAEC. (Mathew et al., 2019) Mientras que en las heces con EAEC también se identificó la familia Veillonelaceae y el género *Veillonella*, ninguno de estos OTUs se han asociado con bacteriotas de diarrea con desnutrición. (Gallardo et al., 2017; Méndez-Salazar et al., 2018)

La presencia de la familia Prevotellaceae (Bacteroidetes) se ha asociado con bacteriotas de sujetos sanos con una dieta alta en fibras y carbohidratos no digeribles por los humanos, por lo tanto, participan en la fermentación de los carbohidratos, lo que trae como resultado la producción de AGCC. (De Filippis et al., 2016; Wu et al., 2011) En particular el género *Prevotella* 9 se ha asociado a bacteriotas de sujetos sanos de comunidades rurales con dietas altas en fibras y con la producción de propionato. (Gorvitovskaia et al., 2016; Mathew et al., 2019) Se ha observado que el propionato disminuye la síntesis hepática del colesterol al inhibir la actividad de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A, la cual es la principal reductasa que actúa en la síntesis del colesterol, a su

vez el propionato es utilizado como sustrato para la gluconeogénesis, la cual es una ruta metabólica que se activa como respuesta al ayuno y permite la síntesis de glucosa a partir de sustratos no glúcidos, esta vía se lleva a cabo principalmente en el hígado. (García Peris et al., 2002; Pérez-mendoza et al., 2012; Rivera & Pérez, 2006). Por otro lado, el género *Veillonella* se ha asociado a la producción de AGCC como propionato y acetato a partir del metabolismo del lactato. (Prasetianto Wicaksono, 2020) El acetato es el AGCC más abundante en el colón, este es metabolizado para la producción de glutamina un aminoácido no esencial y cuerpos cetónicos como el acetoacetato y β hidroxibutirato los cuales pueden ser utilizados en los tejidos como fuente de energía. (García Peris et al., 2002; Markowiak-Kopec & Ślizewska, 2020)

Como resultado el enriquecimiento del género *Prevotella 9* y *Veillonella*, en las muestras de niños con DAEC y EAEC con desnutrición, podrían contribuir a la adaptación de este ambiente intestinal tan restringido en nutrientes, ya que proporcionan sustratos como el propionato, el cual es un sustrato de la gluconeogénesis y a su vez este propionato también podría estar participando en la disminución de la síntesis del colesterol; cuyas concentraciones se encuentran disminuidas en los niños con desnutrición (Fernández Soto et al., 2017) y el acetato, el cual se involucra en la síntesis de glutamina un aminoácido no esencial que puede utilizarse como sustrato en la gluconeogénesis, también para la síntesis de otros aminoácidos y en la producción de cuerpos cetónicos, los cuales en desnutrición se encuentran incrementados y son utilizados como fuentes de energía como respuesta a la falta de glucosa. (García de Lorenzo y Mateos & Rodríguez M., 2013) Por lo que, la presencia de estos géneros podría proporcionar una fuente de energía en estos niños con desnutrición.

En relación con la abundancia relativa de OTUs en muestras de heces de niños con EPECa y desnutrición no se observó ningún OTU enriquecido. Sin embargo, en las heces de los niños con EPECa sin desnutrición, a diferencia

de los niños con DAEC y EAEC, si se identificaron OTUs enriquecidos: las familias del phylum Firmicutes Lachnospiraceae y Ruminococcaceae, así como los géneros *Faecalibacterium* (Ruminococcaceae) y *Bacteroides* (Bacteroidaceae). Este último género también se ha identificado en bacteriotas de niños con diarrea por PEDs. (Gallardo et al., 2017; Mathew et al., 2019; Zafar & Saier, 2021) El género *Faecalibacterium* se ha asociado a bacteriotas de pacientes con infecciones mixtas causadas por virus y EAEC. (Ganesan et al., 2018; Mathew et al., 2019) Las familias de Lachnospiraceae y Ruminococcaceae se han asociado con la producción de butirato en el intestino, además bacterias de la familia Lachnospiraceae también se han asociado con la producción de lactato. (Vacca et al., 2020) El butirato, es la principal fuente de energía para los colonocitos y también inhibe la producción de citocinas proinflamatorias por estas células, como el TNF α , modulando la actividad del factor de transcripción NF- κ B mediada por I κ B α . (García Peris et al., 2002; Lührs et al., 2001; Markowiak-Kopeć & Ślizewska, 2020). El género *Faecalibacterium* se ha asociado a bacteriotas de sujetos con dietas altas en fibra, así como con la producción de butirato. (Ganesan et al., 2018) El género *Bacteroides* está presente en bacteriotas de sujetos con dietas altas en proteínas y grasas, puesto que estas bacterias metabolizan polisacáridos complejos, proteínas y lípidos para la obtención de aminoácidos, vitaminas y propionato. (Gallardo et al., 2017; Mathew et al., 2019; Zafar & Saier, 2021) Por lo tanto, los géneros *Faecalibacterium* y *Bacteroides* están involucrados en la producción de propionato y butirato, respectivamente y podrían estar proporcionando una fuente de energía al niño con diarrea sin desnutrición, puesto que las infecciones implican un gasto energético alto para el hospedero.

Si bien, se ha observado que en los niños sanos la microbiota intestinal suele ser muy diversa, los episodios diarreicos resultan en bacteriotas con menor diversidad, así como muestran un incremento significativo del phylum de Proteobacterias y en una pérdida de bacterias anaerobias. (Braun et al., 2017; Fan et al., 2020; Gallardo et al., 2017; Solano-Aguilar et al., 2013) Por otro

lado, de manera similar en las heces de los niños con desnutrición se observó una pérdida de la diversidad bacteriana y un incremento en el phylum Firmicutes. (Méndez-Salazar et al., 2018) Se ha reportado que los niños con desnutrición presentan bacterias intestinales denominadas “inmaduras” puesto que se parece a la bacteria de niños menores comparados con la bacteria de individuos sanos cronológicamente pareados por la edad. (Blanton et al., 2016; Subramanian et al., 2014) En un estudio realizado en niños peruanos donde se analizó la asociación entre la diarrea, la conformación de la bacteria y el retraso en el crecimiento infantil, mostró que el retraso en el crecimiento infantil comprometía la colonización bacteriana del intestino, así como la incapacidad de recuperar la diversidad antes del episodio diarreico, y esta diversidad disminuía de manera drástica con cada nuevo episodio diarreico. (Rouhani et al., 2020)

La diversidad α , establece tanto la riqueza como la abundancia de los OTUs presentes en cada muestra. (Balseca & Gómez, 2019) En nuestros resultados, no se observó diferencias significativas entre los índices de diversidad α evaluados (OTUs observados <150 y Shannon <3), al comparar las muestras de pacientes con cada uno de los PEDs, ni al comparar las muestras de pacientes con desnutrición vs. sin desnutrición. Los índices observados, fueron similares a la diversidad α de muestras de niños chinos y peruanos con diarrea, (Fan et al., 2020; Mathew et al., 2019; Rouhani et al., 2020) así como en muestras de niños mexicanos desnutridos sin diarrea (Shannon <2.9). (Méndez-Salazar et al., 2018) En contraste, la comparación de la bacteria de los niños sanos del mismo grupo etario de los niños del presente estudio (<3 años) si mostró diferencias significativas en el índice de diversidad α . (Fan et al., 2020; Gallardo et al., 2017; Mathew et al., 2019) Tanto la riqueza como la abundancia de las muestras de los niños sanos mostraron un índice de diversidad α elevado comparado con nuestros resultados sugiriendo que la bacteria de pacientes con diarrea por PEDs con y sin desnutrición, de niños con diarrea y de niños con desnutrición muestran una disminución significativa tanto de riqueza como de abundancia de los OTUs. Esto pone en evidencia

que la variabilidad interindividual es el factor discriminatorio más influyente para la composición de la bacteriota intestinal, por arriba de la dieta y de cambios dietéticos extremos como la desnutrición. (Allaband et al., 2019)

La diversidad β evalúa la disimilitud de los OTUs con bases en el número de OTUs compartidos y exclusivos de cada condición. (Balseca & Gómez, 2019) En este análisis se observó diferencias significativas entre las muestras de pacientes con diarrea causada por DAEC, EAEC y EPECa, similar a lo recientemente reportado de niños con diarrea causada por estos patógenos, corroborando que cada PED dicta una composición de la bacteriota única. (Gallardo et al., 2017; Mathew et al., 2019; Peña-Gonzalez et al., 2019) También observamos diferencias significativas en las muestras de pacientes con cada uno de los PEDs al comparar entre las condiciones de desnutrición vs. sin desnutrición, lo que pone en evidencia que el estatus nutricional es factor determinante en la conformación de la bacteriota intestinal.

Se identificaron posibles biomarcadores bacteriano de la condición de diarrea por PEDs y desnutrición en las heces de los niños, como ya se mencionó utilizando la técnica LDA: la clase Negativicutes, el orden Selenomonadales y la familia Veillonellaceae todos ellos pertenecientes al phylum Firmicutes. En el único estudio realizado en niños mexicanos con desnutrición, se identificó como biomarcador a una familia del phylum Firmicutes, Lachnospiraceae, (Méndez-Salazar et al., 2018) esto pone en evidencia la necesidad de identificar de manera más certera los niveles taxonómicos puesto que no todos los microorganismos del phylum Firmicutes tienen las mismas vías metabólicas por lo que su contribución al ambiente metabólico en el intestino puede ser diferente. Firmicutes es el phylum asociado principalmente a la producción de butirato, (Turnbaugh et al., 2006; Vacca et al., 2020) También, cabe mencionar que nosotros no identificamos biomarcadores previamente identificados en niños con diarrea como *Bacteroides plebeius*, *Bifidobacterium breve*, *Klebsiella*, Proteobacteria y Enterobacteriales. (Fan et al., 2020) Por lo que ahora es importante caracterizar las vías metabólicas de la bacteriota ya

que se ha mostrado que un mismo ambiente metabólico intestinal puede estar dado por grupos bacterianos diferentes.

De tal manera que decidimos analizar el efecto putativo de la composición de la bacteriota en el perfil metabólico de las muestras de pacientes con DAEC, EAEC y EPECa con y sin desnutrición. Lo que observamos es que el perfil metabólico de las bacteriotas de cada patotipo global, así como de cada condición (desnutrición vs. sin desnutrición) por patotipo, fueron diferentes. Por lo que a continuación se describen algunos de los perfiles metabólicos enriquecidos en las bacteriotas de niños con PEDs y desnutrición.

En el perfil metabólico de la bacteriota de los pacientes con DAEC, observamos que algunas de las funciones enriquecidas fueron la biosíntesis del LPS que es el principal lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, como lo son todas las enterobacterias, incluyendo *E. coli*; por lo tanto, esta vía metabólica es indispensable para mantener la viabilidad de estas bacterias en el intestino. (Ormeño-Orrillo, 2005) Otra vía metabólica enriquecida en esta bacteriota fue la de la fijación del carbono que está presente en algunas proteobacterias y que participa en la síntesis de glucosa para su propio consumo, a partir del CO₂ a través Ciclo de Calvin. (Swan et al., 2011) En el perfil metabólico de la bacteriota de los pacientes con EAEC, se observó enriquecida la vía de degradación del tolueno que, a pesar de la toxicidad de este compuesto, algunas bacterias como *Pseudomonas* lo utilizan como fuente de carbono y energía, este grupo bacteriano se identificó en la bacteriota de estos pacientes. (García et al., 2009) Mientras que se encontró enriquecida en la bacteriota de los pacientes con EPECa, la vía de la degradación de la dioxina, la cual es un compuesto tóxico para los seres humanos ya que no lo pueden degradar. La dioxina proviene de contaminantes ambientales clorados, así como de algunos productos de origen animal, afortunadamente varios géneros como *Pseudomonas* y *Burkholderia*, presentes en el bacterioma de estos niños pueden llevar a cabo su degradación, impidiendo que sean intoxicados por este compuesto. (Field &

Sierra-Alvarez, 2008) En este ambiente bajo en nutrientes estas vías metabólicas podrían ser utilizadas por la bacteriota como fuentes de energía permitiendo su supervivencia.

Por otro lado, también se encontraron vías enriquecidas que además de ser esenciales para la supervivencia de las bacterias, también podrían estar aportando metabolitos que pueden ser utilizados en vías metabólicas de los niños (hospedero) con diarrea y desnutrición. Tal es el caso de la vía la biosíntesis de aminoácidos como fenilalanina, tirosina y triptófano, la cual se encontró enriquecida en la bacteriota de los pacientes con DAEC, estos aminoácidos son utilizados como fuente de nutrientes y energía para la supervivencia bacteriota, además participan en la remodelación de la membrana celular y la formación de las esporas bacterianas. (Idrees et al., 2020) La biosíntesis del triptófano y la fenilalanina por las bacterias es una fuente indispensable de estos aminoácidos para el hospedero, ya que los humanos no sintetizan estos aminoácidos, que son indispensables para la síntesis de proteínas humanas; por lo que el hospedero depende de las bacterias para su síntesis, siendo esta una de las simbiosis más importantes entre la bacteriota intestinal y el hospedero. Se ha reportado que, en el estatus de desnutrición, el triptófano es uno de los aminoácidos que está disminuido en el intestino de estos sujetos. El triptófano es un precursor de varios neurotransmisores y también se utiliza en la síntesis de vitamina B3 del hospedero, tal vez esta deficiencia explique el deterioro cognoscitivo de los niños con desnutrición la cual se exagera con la diarrea, así la como la deficiencia en estos niños de vitamina B3. (Gonzalez-Torres & Téllez-Valencia, 2007) Por lo que es sumamente interesante que en el perfil metabólico de éstos pacientes estén enriquecidas estas vías y no así en los niños con DAEC sin desnutrición, ya que podrían ser utilizados por el hospedero con desnutrición para cubrir algunos de los requerimientos indispensables para mantener una homeostasis del sistema nervioso, hasta ahora no se ha documentado si DAEC como otras infecciones entéricas con otros patógenos como EAEC en donde no se encontró enriquecida esta vía metabólica de

aminoácidos, también se asocia con un deterioro cognoscitivo como se ha reportado en niños de las favelas brasileñas. (Steiner et al., 1998) Precisamente la disminución de las poblaciones bacterianas que sintetizan triptófano, como tal parece ser el caso de la microbiota de EAEC, está en línea con las observaciones del eje microbioma-intestino-cerebro, en el cual se habla de una “comunicación” directa que existe entre ellos y es mediada por la microbiota intestinal y ha ayudado a explicar fenómenos como autismo y tal vez también nos ayude a explicar el deterioro cognoscitivo en niños con varios episodios de diarrea en los 2 primeros años de vida.

Por otro lado, de manera interesante se observó que el metabolismo del propionato estaba enriquecido en la bacteriota de los pacientes con EAEC y desnutrición, lo cual coincide con el incremento en la abundancia del género *Veillonella* en esta bacteriota como ya se describió previamente. Este género, se caracteriza por producir propionato un compuesto fundamental para la homeostasis de los enterocitos y como ya se mencionó esto podría estar contribuyendo a la adaptación metabólica que se presenta en la desnutrición. También, en este grupo de pacientes se observó que las vías metabólicas de la D-arginina y la D-ornitina estaban enriquecidas. Estos aminoácidos, con base en la proyección de Fisher presentan al grupo amino funcional (NH_2) a la derecha (D-aminoácidos). Estos D-aminoácidos se han asociado con disminución de la tasa de crecimiento bacteriano, tal vez porque se ha documentado que forman parte de los péptidos antimicrobianos los cuales exhiben actividades antimicrobianas de amplio espectro. (Idrees et al., 2020; Lam et al., 2009) También se encontró en el perfil metabólico de la bacteriota de los pacientes con EPECa enriquecido el metabolismo de algunos aminoácidos como el de la alanina y la tiamina, los cuales son aminoácidos no esenciales que se utilizan en la síntesis de nuevas proteínas o como sustrato para la gluconeogénesis del hospedero). (Gonzalez-Torres & Téllez-Valencia, 2007) Por último, las vías metabólicas de la síntesis y degradación de cuerpos cetónicos también estuvieron enriquecidas en los pacientes con EPECa; como se mencionó anteriormente, en los niños con desnutrición, los cuerpos

cetónicos se encuentran elevados, debido al catabolismo de los lípidos, los cuales son utilizados como fuente de energía, nuevamente este metabolismo de los cuerpos cetónicos podría estar participando en el ajuste metabólico que se lleva a cabo durante la desnutrición. (García Peris et al., 2002; Markowiak-Kopeć & Śliżewska, 2020)

Con respecto al perfil metabólico de las muestras de pacientes con PEDs sin desnutrición, cabe mencionar que las vías metabólicas enriquecidas, aunque diferentes a las de los pacientes con desnutrición también estuvieron relacionadas con la regulación de funciones vitales de las bacterias, el metabolismo de aminoácidos no esenciales, el metabolismo de la vitamina B6 y vías relacionadas con la digestión de carbohidratos, los cuales podrían contribuir a la hemostasis tanto de la bacteriota como del hospedero.

CONCLUSIÓN

Los PEDs fueron los patógenos más frecuentemente identificados en los niños con diarrea aguda y desnutrición de Mérida Yucatán, destacando sobre todo a DAEC, patógeno del cual aún no se tienen muchos reportes, mientras que por otro lado los otros patógenos evaluados fueron mayormente identificados en niños con diarrea y sin desnutrición.

La bacteriota intestinal podría proporcionar características de diagnóstico adicionales para distinguir los diferentes agentes etiológicos de la diarrea, esto debido a que los resultados mostraron que la bacteriota intestinal de los niños con diarrea causada por cualquiera de los tres PEDs (DAEC, EAEC y EPECa) evaluados es distinta, por lo tanto, el patógeno participa directamente en la conformación de la bacteriota. De igual manera, se encontró que la bacteriota intestinal de los niños con diarrea y desnutrición es significativamente diferente a la de los niños con diarrea sin desnutrición, sugiriendo que el estatus nutricional también es un factor determinante en la conformación de la bacteriota. En relación con los posibles biomarcadores bacterianos, estos parecen ser específicos para los niños con diarrea por PEDs ya que fueron los mismos biomarcadores para los tres patotipos, sin embargo, será necesario evaluar si estos biomarcadores son iguales o diferentes con respecto a la infección por otros enteropatógenos.

Un hallazgo interesante y relevante es que tanto los OTUs más abundantes, así como las vías metabólicas enriquecidas en las bacteriotas de los niños con diarrea causada por DAEC y EAEC con desnutrición podrían estar produciendo compuestos que pueden ser utilizados por el hospedero como fuentes de energía y que participan en la homeostasis del enterocito, estos compuestos en su conjunto podrían contribuir a una mejor adaptación metabólica del niño con desnutrición.

Estos nuevos aportes sobre la caracterización de la bacteriota de niños con diarrea ocasionada por PEDs con o sin desnutrición podrían brindar información para el desarrollo de nuevas herramientas para la personalización del tratamiento nutricional y médico, así como también lograr un diagnóstico temprano de estas patologías aun estando en condiciones asintomáticas.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar la bacteriota de los niños con desnutrición y sin diarrea, para evaluar las diferencias que tienen con estas muestras.
- Evaluar la concentración de los AGCC presentes en las muestras y compararlos entre condiciones.
- Caracterizar las moléculas determinadas por el programa PICRUST2 en estas muestras.

REFERENCIAS

- Acosta-Muñiz, C. H., Torres-Aguilar, V., Manjarrez-Domínguez, C. B., Guerrero-Prieto, V. M., Parra-Quezada, R. Á., Noriega-Orozco, L. O., & Ávila-Quezada, G. D. (2015). Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y Plantas Comestibles. ¿Se han Desarrollado Mecanismos de Internalización Bacteriana? *Revista Mexicana de Fitopatología*, 64–83. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1507-4>
- Acosta, G. J., Vigo, N. I., Durand, D., Riveros, M., Arango, S., Zambruni, M., & Ochoa, T. J. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and pathotype distribution in children from peruvian rural communities. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(3), 574–579. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0220>
- Allaband, C., McDonald, D., Vázquez-Baeza, Y., Minich, J. J., Tripathi, A., Brenner, D. A., Looma, R., Smarr, L., Sandborn, W. J., Schnabl, B., Dorrestein, P., Zarrinpar, A., & Knight, R. (2019). Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(2), 218–230. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.09.017>
- Arellano, S. (2019). *México social la cuestion social en México*. México: Un País de Inseguridad Alimentaria. <https://www.mexicosocial.org/mexico-un-pais-de-inseguridad-alimentaria/>
- Aschtgen, M. S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Llobès, R., & Cascales, E. (2008). SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(22), 7523–7531. <https://doi.org/10.1128/JB.00945-08>
- Asea, A., Kaur, P., & Chakraborti, A. (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging enteric food borne pathogen. *Interdisciplinary*

Perspectives on Infectious Diseases, 2010.
<https://doi.org/10.1155/2010/254159>

Balseca, A., & Gómez, C. (2019). Diversidad alfa, beta y gamma: ¿cómo medimos diferencias entre comunidades biológicas? *Nova Acta Científica Compostelana*, 26, 39–45.
http://webspersoais.usc.es/export9/sites/persoais/persoais/carola.gomez/pdfs/Baselga_y_Gomez-Rodriguez2019.pdf

Beamish, L. A., Osornio-Vargas, A. R., & Wine, E. (2011). Air pollution: An environmental factor contributing to intestinal disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 5(4), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2011.02.017>

Bhutta, Z. A., Berkley, J. A., Bandsma, R. H. J., Kerac, M., Trehan, I., & Briend, A. (2017). Severe childhood malnutrition. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17067. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.67>

Black, R. E., Laxminarayan, Ramanan Temmerman, M., & Walker, N. (2016). *The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health: Disease Control Priorities* (W. (DC) (Ed.); 3rd ed.).

Blanton, L. V., Barratt, M. J., Charbonneau, M. R., Ahmed, T., & Gordon, J. I. (2016). Childhood undernutrition, the gut microbiota, and microbiota-directed therapeutics. *Science*, 352(6293).
<https://doi.org/10.1126/science.aad9359>

Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4, 1–12.
<https://doi.org/10.7554/eLife.05826>

Braun, T., Di Segni, A., Benshoshan, M., Asaf, R., Squires, J. E., Farage Barhom, S., Glick Saar, E., Cesarkas, K., Smollan, G., Weiss, B., Amit, S., Keller, N., & Haberman, Y. (2017). Fecal microbial characterization of hospitalized patients with suspected infectious diarrhea shows significant dysbiosis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598->

017-01217-1

- Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., & Gibson, D. L. (2012). Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, *4*(8), 1095–1119. <https://doi.org/10.3390/nu4081095>
- Cario, E., Gerken, G., & Podolsky, D. K. (2004). Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*, *127*(1), 224–238. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.015>
- Checkley, W., Gilman, R. H., Black, R. E., Lescano, A. G., Cabrera, L., Taylor, D. N., & Moulton, L. H. (2002). Effects of nutritional status on diarrhea in Peruvian children. *Journal of Pediatrics*, *140*(2), 210–218. <https://doi.org/10.1067/mpd.2002.121820>
- Collada, V. R. L., Bautista-Márquez, A., Sánchez-Uribe, E., & Esparza-Aguilar, M. (2020). Impacto poblacional a 10 años de la vacunación contra rotavirus en México. *Salud Publica de Mexico*, *62*(1), 6–13. <https://doi.org/10.21149/9936>
- CONEVAL. (2021). *Consejo Nacional de Evaluacion de la Política de Desarrollo Social*. https://www.coneval.org.mx/coordinacion/entidades/yucatan/Paginas/pob_municipal.aspx
- Conlon, M. A., & Bird, A. R. (2015). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, *7*(1), 17–44. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

- Cuevas-Nasu, L., Gaona-Pineda, E. B., Rodríguez-Ramírez, S., Morales-Ruán, M. D. C., González-Castell, L. D., García-Feregrino, R., Gómez-Acosta, L. M., Ávila-Arcos, M. A., Shamah-Levy, T., & Rivera-Dommarco, J. (2019). Desnutrición crónica en población infantil de localidades con menos de 100 000 habitantes en México. *Salud Pública de México*, *61*, 833–840. <https://doi.org/10.21149/10642>
- Dadonaite, B., Ritchie, H., & Roser, M. (2019). *Diarrheal diseases*. <https://ourworldindata.org/diarrheal-diseases#what-pathogens-are-responsible-for-diarrheal-diseases>
- De Filippis, F., Pellegrini, N., Laghi, L., Gobbetti, M., & Ercolini, D. (2016). Unusual sub-genus associations of faecal *Prevotella* and *Bacteroides* with specific dietary patterns. *Microbiome*, *4*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0202-1>
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- Dean, P., & Kenny, B. (2009). The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Current Opinion in Microbiology*, *12*(1), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.11.006>
- ENSANUT. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*. <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/doctos/informes/Yucatan-OCT.pdf>
- Estrada-Garcia, T., & Navarro-Garcia, F. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: A genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*,

66(3), 281–298. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.01008.x>

Estrada-Garcia, T., Perez-Martinez, I., Bernal-Reynaga, R., & Zaidi, M. B. (2015). Enteroaggregative coli: A Pathogen Bridging the North and South. *Curr Trop Med Rep*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0018-7>. Enteroaggregative

Fan, Q., Yi, M., Liu, H., Wang, Y., Li, X., Yuan, J., Wang, L., Hou, B., & Li, M. (2020). The impact of age and pathogens type on the gut microbiota in infants with diarrhea in Dalian, China. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8837156>

Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000400009>

Fernández García, Mercedes, Fernández Rodríguez, Celia, Martínez Furé, G., Pérez Ramos, E., Cuza Arribas, C., & Acosta López, J. (2004). Etiología de la diarrea con sangre en menores de 5 años. *Revista Cubana de Pediatría*, 74. https://doi.org/http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312004000400006

Fernández Soto, G. F., Quintero Nieto, J. C., Troya Ortiz, E. V., Arráiz de Fernández, C., & Romero Adrian, T. B. (2017). Variaciones del perfil lipídico en pacientes pediátricos con desnutrición. *Enfermería Investiga: Investigación, Vinculación, Docencia y Gestión*, 2(2), 72–76. <https://doi.org/10.29033/ei.v2n2.2017.07>

Field, J. A., & Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial degradation of chlorinated dioxins. *Chemosphere*, 71(6), 1005–1018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.10.039>

- Gallardo, P., Izquierdo, M., Vidal, R. M., Chamorro-Veloso, N., Rosselló-Móra, R., O’Ryan, M., & Farfán, M. J. (2017). Distinctive gut microbiota is associated with Diarrheagenic *Escherichia coli* infections in Chilean children. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00424>
- Ganesan, K., Chung, S. K., Vanamala, J., & Xu, B. (2018). Causal relationship between diet-induced gut microbiota changes and diabetes: A novel strategy to transplant *Faecalibacterium prausnitzii* in preventing diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123720>
- García-Montero, C., Fraile-Martínez, O., M., G.-L. A., Pekarek, L., Castellanos, A. J., Noguerales-fraguas, F., Coca, S., Guijarro, L. G., García-Honduvilla, N., Asunsolo, A., Sánchez-trujillo, L., Lahera, G., Bujan, J., Monserrat, J., Álvarez-Mon, M., Álvarez-Mon, M. A., & Ortega, M. A. (2021). Diet at the Gut Microbiota – Immune System Interplay. *Nutrients*, 13(699), 1–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nu13020699>
- García de Lorenzo y Mateos., A., & Rodríguez M., J. A. (2013). Metabolismo en el ayuno y la agresión. Su papel en el desarrollo de la desnutrición relacionada con la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/pdf/3092/309228933001.pdf>
- García, I., Hernández, S., Favela, E., Auria, R., & Revah, S. (2009). Degradación De Tolueno Con Hongos. *Institut de Recherche Pour Le Développement*, 20–21. https://doi.org/https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJO/AREA_VI/CVI-28.pdf
- García Peris, P., Bretón Lesmes, I., de la Cuerda Compes, C., & Cambor Álvarez, M. (2002). Metabolismo colónico de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*, 17(2), 11–16. <https://doi.org/http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3360.pdf>

- Gebreyesus Wasihun, A., Asmelash Dejene, T., Teferi, M., Marugán, J., Negash, L., Yemane, D., & McGuigan, K. G. (2018). Risk factors for diarrhoea and malnutrition among children under the age of 5 years in the Tigray Region of Northern Ethiopia. *PLoS ONE*, *13*(11), 32–39. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207743>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gonzalez-Torres, L., & Téllez-Valencia, A. (2007). Las proteínas en la nutrición. *Revista Salud Pública y Nutrición*, *8*(2). <https://doi.org/10.2514/2.5526>
- Gorvitovskaia, A., Holmes, S. P., & Huse, S. M. (2016). Interpreting prevotella and bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*, *4*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0160-7>
- Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology*, *2*, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00094>
- Guerrant, R. L., Schorling, J. B., & McAuliffe, J. F. (1992). Diarrhea as a Cause and an Effect of Malnutrition: Diarrhea Prevents Catch-up Growth and Malnutrition Increases Diarrhea Frequency and Duration. *Am J Trop Med Hyg*, *47*, 28–35. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.28>. PMID: 1632474.
- Gutiérrez Carbajal, M. G., Magaña Magaña, M. A., Zizumbo Villareal, D., & Ballina Gómez, H. (2019). Diversidad agrícola y seguridad alimentaria nutricional en dos localidades Mayas de Yucatán. *Acta Universitaria*, *29*, 1–14. <https://doi.org/10.15174/au.2019.1996>
- Idrees, M., Mohammad, A. R., Karodia, N., & Rahman, A. (2020). Multimodal

role of amino acids in microbial control and drug development. *Antibiotics*, 9(6), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060330>

INEGI. (2018). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018*. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Janeway CA Jr, Travers P, W. M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (G. Science (Ed.); 5th ed.).

Jumpertz, R., Le, D. S., Turnbaugh, P. J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J. I., & Krakoff, J. (2011). Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(1), 58–65. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.010132>

Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, 14(7), 685–690. <https://doi.org/10.1038/ni.2608>

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S. O., Sur, D., Breiman, R. F., Faruque, A. S. G., Zaidi, A. K. M., Saha, D., Alonso, P. L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., ... Levine, M. M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A prospective, case-control study. *The Lancet*, 382(9888), 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2)

Kundu, P., Blacher, E., Elinav, E., & Pettersson, S. (2017). Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell*, 171(7), 1481–1493.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.024>

Lam, H., Oh, D. C., Cava, F., Takacs, C. N., Clardy, J., De Pedro, M. A., & Waldor, M. K. (2009). D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science*, 325(5947), 1552–1555. <https://doi.org/10.1126/science.1178123>

Lawrence, J. G., & Roth, J. R. (1996). Evolution of coenzyme B12 synthesis among enteric bacteria: Evidence for loss and reacquisition of a multigene complex. *Genetics*, 142(1), 11–24. <https://doi.org/https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8770581/>

Levy Farín, A. (1980). Interacción diarrea-desnutrición. *Colombia Medica*, 11(4), 138–144. <https://doi.org/https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/3347/3355>

Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P., Roy, R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Mark, D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), 20144. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>. Evolution

Lührs, H., Gerke, T., Schaubert, J., Dusel, G., Melcher, R., Scheppach, W., & Menzel, T. (2001). Cytokine-activated degradation of inhibitory κ B protein α is inhibited by the short-chain fatty acid butyrate. *International Journal of Colorectal Disease*, 16(4), 195–201. <https://doi.org/10.1007/s003840100295>

Lupp, C., Robertson, M. L., Wickham, M. E., Sekirov, I., Champion, O. L., Gaynor, E. C., & Finlay, B. B. (2007). Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host and Microbe*, 2(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.010>

Markowiak-Kopec, P., & Śliżewska, K. (2020). The effect of probiotics on the

production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. *Nutrients*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/nu12041107>

Mathew, S., Smatti, M. K., Al Ansari, K., Nasrallah, G. K., Al Thani, A. A., & Yassine, H. M. (2019). Mixed Viral-Bacterial Infections and Their Effects on Gut Microbiota and Clinical Illnesses in Children. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37162-w>

Méndez-Salazar, E. O., Ortiz-López, M. G., Granados-Silvestre, M. D. L. Á., Palacios-González, B., & Menjivar, M. (2018). Altered gut microbiota and compositional changes in firmicutes and proteobacteria in mexican undernourished and obese children. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02494>

Meza-Segura, M. (2017). *Caracterización de los factores asociados a la severidad de la diarrea causada por los patogrupos de Escherichia coli*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Meza-Segura, M., & Estrada-Garcia, T. (2016). Diffusely Adherent Escherichia coli. In *Escherichia Coli in the Americas* (Issue 2508, pp. 125–147). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45092-6>

Meza-Segura, M., Mussaret B., Z., Vera-Ponce de León, A., Moran-Garcia, N., Martinez-Romero, E., Nataro, J. P., & Estrada-Garcia, T. (2020). New Insights Into DAEC and EAEC Pathogenesis and Phylogeny. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572951>

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant

Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4), 1–67.
<https://doi.org/10.1128/mnbr.00036-17>

Mondal, D., Rashidul, H., Sack, R. B., Beth, K., & Petri, W. A. (2009). Attribution of Malnutrition to Cause Specific Diarrhea Illness: Evidence from a Prospective Study of Preschool Children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(5), 824–826.

Moreira, A. P. B., Texeira, T. F. S., Ferreira, A. B., Do Carmo Gouveia Peluzio, M., & De Cássia Gonçalves Alfenas, R. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *British Journal of Nutrition*, 108(5), 801–809.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512001213>

Ochoa, T. J., Mercado, E. H., Durand, D., Rivera, F. P., Mosquito, S., Contreras, C., Riveros, M., Lluque, A., & Barletta, F. (2011). Frecuencia y patotipos de Escherichia coli diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(1), 13–20.
https://doi.org/http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342011000100003

OMS. (2017). *Enfermedades diarreicas*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>

OMS. (2021). *World Health Organization*. <https://www.who.int/>

Opintan, J. A., Bishar, R. A., Newman, M. J., & Okeke, I. N. (2010). Carriage of diarrhoeagenic Escherichia coli by older children and adults in Accra, Ghana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(7), 504–506. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.02.011>

Ormeño-Orrillo, E. (2005). Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: Estructura y biosíntesis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3–4), 165–175.
https://doi.org/https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-3_4l.pdf

- Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S., Giustina, A., & Gazzaruso, C. (2018). Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*, 61(3), 357–371. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1605-5>
- Patzi-Vargas, S., Zaidi, M. B., Perez-Martinez, I., León–Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D., & Estrada-Garcia, T. (2015). Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003510>
- Pedraza, D. F. (2004). Estado nutricional como factor y resultado de la seguridad alimentaria y nutricional y sus representaciones en Brasil. *Revista de Salud Pública*, 6(2), 140–155. <https://doi.org/10.1590/s0124-00642004000200002>
- Peña-Gonzalez, A., Soto-Giron, M. J., Smith, S., Sistrunk, J., Montero, L., Pa, M., Ortega, E. and acute;a, Hatt, J. K., Cevallos, W., Trueba, G., Levy, K., & Konstantinidis, K. T. (2019). Metagenomic signatures of gut infections caused by different *Escherichia coli* pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(24), 1–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01820-19>
- Pérez-mendoza, M., De Ita-pérez, D., & Díaz-muñoz, M. (2012). Gluconeogénesis: Una visión contemporánea de una vía metabólica antigua. *Revista de Educación Bioquímica*, 31(1), 10–20. <https://doi.org/https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=36104>
- Pham, T. P. T., Tidjani Alou, M., Bachar, D., Levasseur, A., Brah, S., Alhousseini, D., Sokhna, C., Diallo, A., Wieringa, F., Million, M., & Raoult, D. (2019). Gut Microbiota Alteration is Characterized by a Proteobacteria and Fusobacteria Bloom in Kwashiorkor and a Bacteroidetes Paucity in Marasmus. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598->

019-45611-3

Philipson, C. W., Bassaganya-riera, J., & Hontecillas, R. (2013). Animal models of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *Gut Microbes*, 4(4), 281–291.

<https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744513/pdf/gmic-4-281.pdf>

Quigley, E. M. M. (2011). Microflora modulation of motility. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 17(2), 140–147.
<https://doi.org/10.5056/jnm.2011.17.2.140>

Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J. F., Morán-García, N., Meza-Segura, M., & Estrada-García, T. (2019). *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: Prevalencia, patogénesis y modelos murinos. *Gaceta Medica de Mexico*, 155(4), 410–416.
<https://doi.org/10.24875/GMM.19004716>

Rivera, O., & Pérez, R. (2006). ESTATINAS Y ACV: CONCEPTOS ACTUALES EN PREVENCIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA DEL ATAQUE CEREBRAL. *La Opinion Del Experto*, 54(4), 301–312.

Rouhani, S., Griffin, N. W., Yori, P. P., Gehrig, J. L., Olortegui, M. P., Salas, M. S., Trigos, D. R., Moulton, L. H., Houpt, E. R., Barratt, M. J., Kosek, M. N., & Gordon, J. I. (2020). Diarrhea as a potential cause and consequence of reduced gut microbial diversity among undernourished children in Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 71(4), 989–999.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciz905>

Secretaria de salud. Anuario de morbilidad 2019. (2019). *México: Dirección General de Epidemiología/Secretaría de Salud: 2019*.
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2019/principales/nacional/grupo_edad.pdf

Solano-Aguilar, G., Fernandez, K. P., Ets, H., Molokin, A., Vinyard, B., Urban,

- J. F., & Gutierrez, M. F. (2013). Characterization of fecal microbiota of children with diarrhea in 2 locations in Colombia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(5), 503–511. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318282aa12>
- Steiner, T. S., Lima, A. A. M., Nataro, J. P., & Guerrant, R. L. (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases*, 177(1), 88–96. <https://doi.org/10.1086/513809>
- Subramanian, S., Huq, S., Yatsunenکو, T., Haque, R., Alam, M. A., Benezra, A., Destefano, J., Meier, M. F., Muegge, B. D., Barratt, M. J., Vanarendonk, L. G., Zhang, Q., Province, A., Petri, W. A., Ahmed, T., & Gordon, J. I. (2014). Persistent Gut Microbiota Immaturity in Malnourished Bangladeshi Children. *Nature*, 510(7505), 417–421. <https://doi.org/10.1038/nature13421>. Persistent
- Swan, B. K., Martinez-Garcia, M., Preston, C. M., Sczyrba, A., Woyke, T., Lamy, D., Reinthaler, T., Poulton, N. J., Masland, E. D. P., Gomez, M. L., Sieracki, M. E., DeLong, E. F., Herndl, G. J., & Stepanauskas, R. (2011). Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science*, 333(6047), 1296–1300. <https://doi.org/10.1126/science.1203690>
- Tickell, K. D., Pavlinac, P. B., John-Stewart, G. C., Denno, D. M., Richardson, B. A., Naulikha, J. M., Kirera, R. K., Swierczewski, B. E., Singa, B. O., & Walson, J. L. (2017). Impact of childhood nutritional status on pathogen prevalence and severity of acute diarrhea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1337–1344. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0139>
- Tickell, K. D., Sharmin, R., Deichsel, E. L., Lamberti, L. M., Walson, J. L., Faruque, A. S. G., Pavlinac, P. B., Kotloff, K. L., & Chisti, M. J. (2020). The

effect of acute malnutrition on enteric pathogens, moderate-to-severe diarrhoea, and associated mortality in the Global Enteric Multicenter Study cohort: a post-hoc analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e215–e224. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30498-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30498-X)

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>

Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2013). Defining the Human Microbiome. *New England Journal of Medicine*, 299(23), 1278–1280. <https://doi.org/10.1056/nejm197812072992304>

Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., Portincasa, P., Gobbetti, M., & De Angelis, M. (2020). The controversial role of human gut lachnospiraceae. *Microorganisms*, 8(4), 1–25. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040573>

Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105–108. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>

Zafar, H., & Saier, M. H. (2021). Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1848158>

Zimmer, J., Lange, B., Frick, J. S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A.,

Rusch, K., Klosterhalfen, S., & Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 53–60. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2011.141>