



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo A. C.**

**DIETA Y DISBIOSIS INTESTINAL EN NIÑOS CON  
DIABETES TIPO 1 O ENFERMEDAD CELIACA DE  
LARGA EVOLUCIÓN: ESTUDIO DE CASOS**

---

Por:

**I.B. Glenda Azucena Alcántar Arellano**

TESIS APROBADA POR LA:


**COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

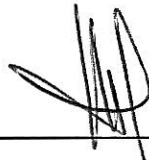
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Glenda Azucena Alcántar Arellano la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Nutrición.



---

Dra. Ana María Calderón de la Barca

Directora de Tesis



---

Dra. Verónica Mata Haro

Asesora



---

Dr. Luis Quihui Cota

Asesor



---

M. en C. Adriana Verónica Bolaños Villar

Asesora

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González

Director General

## DEDICATORIA

*A todos aquellas personas que me enseñaron algo en algún punto de este camino y han contribuido a encontrar las piezas del rompecabezas.*

*“Per aspera ad astra”*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo durante dos años del Programa de Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C donde se me abrieron las puertas, estudié la maestría y por ser un lugar de grandes aprendizajes.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca, por haber gestionado y dirigido este proyecto y por las lecciones obtenidas, en varios sentidos.

A la Dra. Verónica Mata, al Dr. Luis Quihui y a la M.C. Adriana Bolaños por su colaboración y asesoría tanto en las clases como en el desarrollo de la investigación

A todas las personas que participaron en el proyecto, compañeros de maestría, de laboratorio, a los participantes y sus padres.

A todos los compañeros del Laboratorio de Proteínas, que en algún momento contribuyeron con este trabajo, desde los preliminares, en el trabajo de campo, en el laboratorio o con información para enriquecer el proyecto.

A los verdaderos amigos que estuvieron presentes durante este proceso.



## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tablas .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	2
Microbiota intestinal, características y funciones .....	2
Diabetes Tipo 1.....	4
Enfermedad celiaca.....	6
Influencia de la dieta en la microbiota.....	7
Modificaciones dietéticas en DT1 y EC.....	10
Efecto de fármacos usados en DT1 y EC sobre la microbiota.....	12
Sistema inmune, DT1 y EC.....	13
Factores que afectan la permeabilidad intestinal.....	17
Planteamiento de la pregunta de investigación .....	19
<b>HIPÓTESIS</b> .....	20
<b>OBJETIVOS</b> .....	20
<b>PARTICIPANTES Y MÉTODOS</b> .....	21
Evaluación antropométrica y de la dieta.....	21
Colección de muestras y extracción de ADN genómico.....	22
Tipificación de haplotipos.....	23
PCR en tiempo real para cuantificar <i>Prevotella</i> y <i>Bacteroides</i> .....	23
Análisis de datos.....	25

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	26
Participantes en el estudio .....	26
Composición de la dieta.....	31
Microbiota fecal.....	38
Dieta y microbiota intestinal en DT1 y EC.....	46
<b>CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	56



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Aporte de los nutrimentos a la energía consumida por los participantes en el grupo de diabéticos tipo 1.....	32
2. Promedio del aporte energético de macronutrientes en la dieta del grupo de diabéticos tipo 1.....	32
3. Aporte de los nutrimentos a la energía consumida por los participantes en el grupo con enfermedad celiaca.....	34
4. Aporte de los nutrimentos a la energía consumida por los participantes en el grupo de niños saludables, de referencia...	36
5. Promedio del aporte energético de macronutrientes en la dieta del grupo control .....	37
6. Curvas estándar de iniciadores de <i>Prevotella</i> (A) y <i>Bacteroides</i> (B) y posición de muestras (C1, C2 y C3) de abundancia conocida, como referencias .....	39
7. Cuantificación individual de <i>Prevotella</i> y <i>Bacteroides</i> en niños con DT1 con al menos 1 año de evolución.....	42
8. Cuantificación promedio (corregida) de <i>Prevotella</i> y <i>Bacteroides</i> en niños con DT1 con al menos un año de evolución.....	42
9. Cuantificación individual de <i>Prevotella</i> y <i>Bacteroides</i> en niños con enfermedad celiaca con al menos un año de evolución.....	43
10. Cuantificación individual de <i>Prevotella</i> y <i>Bacteroides</i> en heces de niños sanos.....	44
11. Cuantificación grupal de <i>Prevotella</i> y <i>Bacteroides</i> en heces de niños sanos.....	45

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Iniciadores utilizados en la tipificación de haplotipos.....	23
2. Condiciones óptimas para el alineamiento, extensión y amplificación en la cuantificación de <i>Prevotella</i> y <i>Bacteroides</i> ...	24
3. Secuencias de iniciadores utilizados para <i>Prevotella</i> y <i>Bacteroides</i> .....	25
4. Características de participantes del grupo con diabetes tipo 1...	27
5. Características de participantes del grupo con enfermedad celiaca.....	28
6. Características de participantes en el grupo control.....	30
7. Nutrientes (como porcentajes de la energía total) y fibra (g/día) en la dieta de niños con DT1; y acumulación relativa de <i>Bacteroides</i> y <i>Prevotella</i> en heces.....	46
8. Nutrientes (como porcentajes de la energía total) y fibra (g/día) en la dieta de niños con EC; y acumulación relativa de <i>Bacteroides</i> y <i>Prevotella</i> en heces.....	50
9. Nutrientes (como porcentajes de la energía total) y fibra (g/día) en la dieta de niños saludables; y acumulación relativa de <i>Bacteroides</i> y <i>Prevotella</i> en heces.....	52

## RESUMEN

La diabetes tipo 1 (DT1) y la enfermedad celiaca (EC) son enfermedades autoinmunes, ambas desarrolladas principalmente en la niñez, cuando hay predisposición genética asociada con factores ambientales, influenciando la composición de la microbiota intestinal. En niños sonorenses saludables, más del 50% de la microbiota es Bacteroidetes, predominando *Prevotella* sobre *Bacteroides*. En los niños con DT1 activa, dicha relación se invierte y no se recupera tal disbiosis durante la evolución de la enfermedad. El objetivo de esta tesis fue evaluar si las restricciones dietéticas son las responsables de dicha disbiosis en niños con DT1 o EC. Se registró historial clínico. Se evaluó antropometría y dieta. Se analizaron haplotipos y autoanticuerpos. Se cuantificaron *Prevotella* y *Bacteroides* en heces, por PCR tiempo real. Participaron 7 niños con DT1, 4 con EC y 8 sin esas patologías, como referencia. El alelo predominante de los niños con DT1 o EC fue DQB1\*0302. De acuerdo a los valores de puntaje Z de IMC/Edad, los niños con DT1 o EC presentaban desde desnutrición leve hasta sobrepeso. En la dieta de aquéllos con DT1 se observó reducción sustantiva de carbohidratos y aumento de grasas totales y saturadas, respecto a los saludables. Mientras *Prevotella* fue prevalente en niños saludables, en aquéllos con DT1 o EC casi no se detectó. *Bacteroides* se presentó en todos los participantes, con mayor acumulación en los niños con DT1. En conclusión, se observó una modificación en la dieta de los niños con DT1, lo cual podría afectar la microbiota y limitar la recuperación de su equilibrio, durante la evolución de la DT1 o EC.

**Palabras Clave:** Dieta, microbiota, diabetes tipo 1, enfermedad celiaca, *Prevotella*, *Bacteroides*.

## ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) and celiac disease (CD) are autoimmune diseases with onset principally in genetically predisposed children, and associated to environmental factors that influence the intestinal microbiota composition. In healthy Sonoran children more than 50% of the microbiota is Bacteroidetes, mainly *Prevotella* above *Bacteroides*. In active T1D, microbiota is in dysbiosis and it is not completely recovered after the disease control. The aim of this thesis was to evaluate if the dietary restrictions are responsible of the microbiota dysbiosis in children with T1D or CD. Clinical history was recorded, anthropometry and diet, were evaluated, and haplotypes and auto-antibodies were analyzed. *Bacteroides* and *Prevotella* in feces were quantified by real-time PCR. Seven T1D, 4 CD and 8 healthy children as control participated in the study. The predominant allele was DQB1\*0302 in T1D and CD children. According to Z scores of BMI/age children ranged from mild undernourished to overweight. In T1D children diet, carbohydrates were substantively reduced while total and saturated fats were increased in comparison to healthy children' diet. Although *Prevotella* was prevalent in healthy children it was almost undetected in T1D or EC children. *Bacteroides* was quantified in all the participants with higher accumulations in T1D children. In conclusion, a dietary modification affecting the microbiota composition was observed, especially in T1D children, which could affect the microbiota balance along the T1D or CD evolution.

**Keywords:** Diet, Microbiota, Type 1 Diabetes, Celiac Disease, *Prevotella*, *Bacteroides*.

## INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 1 (DT1) y la enfermedad celiaca (EC) comparten factores desencadenantes. Ambas son enfermedades autoinmunes se presentan principalmente en la niñez y juventud y comparten predisposición genética ligada a los marcadores HLA de clase II, HLA-DQ2 y DQ8 (Garavito *et al.*, 2005; Ivarsson *et al.*, 2013). Además, hay otros factores que requieren para activarse, los cuales podrían inducir la inflamación, seguida de pérdida de células beta del páncreas en la DT1 (Dabelea, 2009) y de las del epitelio intestinal en la EC (Ivarsson *et al.*, 2013).

Se han estudiado gran parte de los elementos sobre la patogénesis de la EC, pero aún faltan algunas piezas de ese rompecabezas. Por su parte, sobre la patogénesis de DT1 no se sabe mucho y su estudio se hace más complejo al saber que la autoinmunidad precede hasta por años, a sus manifestaciones clínicas (Gillespie *et al.*, 2014).

En este contexto, los primeros estudios sobre microbiota intestinal y su asociación con la dieta (Wu *et al.*, 2011), que a su vez se relaciona con la respuesta inmune (Sekirov *et al.*, 2010), han estimulado la investigación sobre microbiota en DT1 y EC. Así, ya hay resultados sobre la disbiosis en la microbiota en estas enfermedades activas (Mejía-León *et al.*, 2014; Murri *et al.*, 2013; Schippa *et al.*, 2010; Francavilla *et al.*, 2014). También se conoce que una vez diagnosticadas, se hacen cambios sustantivos en la composición de la dieta (Patton *et al.*, 2013; Kurppa *et al.*, 2012). Lo que se desconoce es, si las restricciones dietéticas debidas a la enfermedad autoinmune, influyen en la recuperación del equilibrio en la microbiota, una vez controladas; lo cual es el objetivo de esta tesis.

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### Microbiota Intestinal, Características y Funciones

Se conoce como microbiota intestinal al conjunto de microorganismos en el ecosistema que coloniza el tracto gastrointestinal. Incluye alrededor de 100 billones de bacterias de aproximadamente 500 a 1000 especies distintas (Eckburg *et al.*, 2005; Tannock, 2007). Los productos del metabolismo de la microbiota, así como sus estructuras moleculares más externas, son detectados y reconocidos por moléculas y células en la mucosa que recubre el intestino. Para tal reconocimiento, la mucosa cuenta con estructuras y funciones como glándulas, secreciones, receptores y actividad mecánica, ya que es la superficie donde ocurre el intercambio y comunicación entre el medio interno y externo. Así, las bacterias intestinales tienen influencia y relevancia no solo patológica sino fisiológica, en el intestino del hospedero (Guarner, 2007).

En el estómago y el duodeno hay relativamente pocos microorganismos adheridos a la superficie mucosa o en tránsito, debido a las secreciones así como la constante actividad motora, que impiden una colonización estable. La cantidad de bacterias aumenta progresivamente conforme se avanza a lo largo del yeyuno y del íleon. En el extremo ileal, predominan los microorganismos aerobios Gram negativos y algunos anaerobios obligados (Guarner, 2007). La distribución microbiana está influenciada por el hábitat a lo largo del tracto gastrointestinal, con variaciones fundamentales en pH, concentración de oxígeno y disponibilidad de nutrientes (DiBaise *et al.*, 2008).

En la microbiota intestinal occidental predominan las divisiones Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y en menor proporción Verrucomicrobia,

Actinobacteria y Tenericutes (Goodrich *et al.*, 2014). Arumugam *et al.* (2011), proponen clasificar los metagenomas intestinales en 3 enterotipos: *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*; los dos primeros de la división Bacteroidetes y el segundo de Firmicutes. Dichos autores consideran que la posibilidad de sintetizar vitaminas de los tres enterotipos es la fuerza evolutiva de la simbiosis. Los *Bacteroides* ofrecen enzimas involucradas en la biosíntesis de biotina, riboflavina, pantoteno y ascorbato. *Prevotella* brinda tiamina y folato, y *Ruminococcus* expresa enzimas involucradas en el metabolismo del grupo Heme, participante en el metabolismo de oxígeno (Qi *et al.*, 1999).

La gran biodiversidad en el ecosistema intestinal humano favorece la vida y el desarrollo, tanto de las comunidades bacterianas como del hospedero (Hooper *et al.*, 2012). El perfil del microambiente intestinal tiende a ser tolerogénico, por el constante contacto con los alimentos y bacterias comensales (Artis, 2008). La relación y adaptación entre las bacterias comensales y su reconocimiento por el sistema inmune del huésped, son la base del desarrollo y diversificación del sistema adaptativo (Chow *et al.*, 2011; Lee & Mazmanian, 2010). En el proceso de inmunomodulación se inducen varios subtipos de células CD4+ reguladoras y las células T invariantes asociadas a mucosa (Corthésy *et al.*, 2007).

Se han identificado tres funciones elementales en la microbiota intestinal. La primera es de tipo nutricional y metabólica. La flora entérica metaboliza los sustratos o residuos dietéticos no digeribles, el moco endógeno y los detritos celulares. Así mismo, transforma carcinógenos potenciales a no carcinogénicos como los compuestos N-nitroso y aminas heterocíclicas y la activación de algunos compuestos bioactivos como los fitoestrógenos (DiBaise *et al.*, 2008). Al haber gran diversidad en la comunidad microbiana, y por ende de genes provenientes de la misma, se multiplica la variedad de enzimas y vías bioquímicas además de los recursos propios del hospedero (Gill *et al.*, 2006).

La segunda función de la microbiota es de protección. Las bacterias, al ocupar un nicho ecológico impiden que se establezcan bacterias ajenas al ecosistema, como serían las oportunistas en el tracto intestinal. La acción de barrera ejercida por la microbiota se debe a que ciertas bacterias secretan bacteriocinas, que inhiben el desarrollo de otras bacterias, además de la competencia por nutrientes y espacio en el intestino (Brook, 1999).

Finalmente, la tercera de las funciones principales es trófica. Las bacterias intestinales tienen la capacidad de controlar la proliferación y diferenciación de las células epiteliales. La interacción con los microorganismos residentes del hospedero repercute en gran medida en la diferenciación celular en el epitelio. Esto se demuestra en la expresión de una diversidad de genes en los animales mono-asociados a cepas bacterianas específicas. Además, los animales poco expuestos tienen atrofia en los folículos linfoides, baja concentración de células linfoides en la mucosa del intestino delgado y de inmunoglobulinas circulantes. Si se exponen a flora convencional, se da una recuperación de las áreas afectadas (Yamanaka *et al.*, 2003; Helgeland *et al.*, 2004).

## Diabetes Tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por la destrucción selectiva y progresiva de las células pancreáticas, productoras de insulina (Dabelea, 2009). Las manifestaciones autoinmunes de la DT1 se detectan por la presencia de anticuerpos anti-islotos (ICA), anti-descarboxilasa del ácido glutámico (anti-GAD) y anti-insulina. Un 10% de los casos son idiopáticos (Abarzúa *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2012).

La insulina es la proteína transportadora de glucosa hacia las células. En condiciones óptimas, la producción de insulina en el cuerpo depende de la acumulación de glucosa en sangre. Al elevarse, se activa la producción de



insulina. Una vez que se ha diagnosticado la DT1 es necesario iniciar el tratamiento con insulina de forma inmediata (Prieto-Tenreiro *et al.*, 2012).

Los genes HLA clase II contribuyen en un 50% al riesgo a desarrollar DT1 (Notkins & Lenmark, 2001); en el 95% de los pacientes con DT1 se encuentran los haplotipos HLA-DQ8 (A1\*0301 y B1\*0302) solos o combinados con DQ2 (A\*0501 y B1\*0201). Además, de la asociación con DRB1\*0302 y DQB1\*0602 (Garavito *et al.*, 2005).

En la DT1, la tasa de destrucción de células beta es variable, en algunos individuos es rápida con tendencia a la cetoacidosis y en otros es lenta. Algunas líneas de evidencia sugieren que la autoinmunidad no es la única causa de destrucción de células beta. Así, la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) proponen dos subtipos en la clasificación de DT1: la 1A, que presenta auto-anticuerpos y la 1B o idiopática, de etiología desconocida. Los diabéticos 1B en su mayoría hispánicos, afroamericanos o asiáticos, presentan insulinopenia y predisposición a la cetosis, en forma indistinguible de la tipo 1, pero no manifiestan signos de autoinmunidad (Prieto *et al.*, 2012).

Además de la predisposición genética existen factores ambientales capaces de inducir la autoinmunidad contra células  $\beta$  (Ma & Chan, 2009). Entre otros se menciona parto por cesárea (Grönlund *et al.*, 1999), deficiencia de vitamina D (Grant, 2008), exposición temprana a proteínas de la leche de vaca (Cavallo *et al.*, 1996), exposición limitada a microorganismos durante la infancia (Wills-Karp *et al.*, 2001) y obesidad infantil (Furlanos *et al.*, 2008). La suma de estos factores lleva a la pérdida de la tolerancia inmunológica intestinal y la participación de células T auto-reactivas en pacientes susceptibles, pero para esto se requiere un gatillo que accione el proceso (Aguirre *et al.*, 2012).

Se ha hipotetizado que el desbalance en la composición de la microbiota intestinal es uno de los detonantes de la DT1. De acuerdo a Brown *et al.* (2011), en niños sanos hay entre 20 y 140 veces más *Prevotella* y *Akkermansia* que en los diabéticos. También en niños sonorenses con DT1 en comparación a niños saludables, resultó una disbiosis con disminución de *Prevotella* y aumento de *Bacteroides*, en aquéllos con DT1 (Mejía-León *et al.*, 2014). *Prevotella* es productora de butirato e induce la síntesis de mucina, que recubre la mucosa intestinal, preservando su integridad. Las alteraciones en la microbiota de los niños prediabéticos y diabéticos con mayor proporción de *Bacteroides*, podrían justificar el aumento de la permeabilidad, la inflamación subclínica del intestino delgado y la desregulación de la tolerancia oral (Vaarala, 2013).

Algunos de los trabajos antes citados, se sustentan en la llamada hipótesis de la higiene de Strachan (1989), quien propuso que en el occidente habrían disminuido el número de especies que colonizan el cuerpo humano, debido a los avances tecnológicos del siglo XX (Parker, 2014). Apoyándose en dicha hipótesis, Bach (2002), propuso que las infecciones pueden modular de alguna manera las respuestas asociadas a alergia y desórdenes autoinmunes. Actualmente, hay evidencias de estudios en humanos y sistemas modelo, de que tanto los microbios como los macroparásitos, pueden modificar la reactividad inmunológica y aliviar patologías como las alérgicas y las autoinmunes (Maizels *et al.*, 2014). Esto abre la posibilidad de prevención, a partir de intervenciones dirigidas, dicen estos últimos autores, con helmintos; y otros autores, por manipulación de la microbiota intestinal.

### Enfermedad Celiaca

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía autoinmune desencadenada por el consumo de gluten y prolaminas relacionadas, en individuos con predisposición genética. LA EC afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. Se caracteriza por una combinación variable de manifestaciones

clínicas dependientes de gluten, anticuerpos específicos de EC, haplotipos HLA DQ2 y/o DQ8 y enteropatía (Ivarsson *et al.*, 2013). El único tratamiento de la EC es una estricta dieta sin gluten tras lo cual los síntomas desaparecen (Kurppa *et al.*, 2012).

El gluten es un conjunto de proteínas, ricas en residuos de prolina y glutamina, en el trigo, el centeno y la cebada. En el tracto gastrointestinal de los mamíferos, no hay proliendopeptidasas, por lo que la degradación de las proteínas del gluten es solo parcial. Como resultado, se originan péptidos de tamaño suficiente para inducir una respuesta inmune, que pueden atravesar el epitelio intestinal, en procesos inflamatorios con ruptura de uniones estrechas intersticiales. Una vez que los péptidos llegan a la *lamina propria*, son sustrato de la enzima transglutaminasa tisular 2, que modifica residuos de glutamina en puntos específicos, a glutamato.

En la EC, las moléculas HLA DQ2 y DQ8 -en las células presentadoras de antígenos- unen péptidos con carga negativa, como los residuos de glutamato (Stepniak *et al.*, 2005). Una vez unidos los péptidos desaminados y/o el complejo péptido-enzima, las células presentadoras los presentan a células T. Así, en los linfocitos T CD4+ se desencadena una respuesta Th1, caracterizada por la producción de anticuerpos anti-gliadinas y anti-transglutaminasa, así como por la liberación de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Este último, potencia la presentación de antígenos asociados al HLA y amplifica la fase de reconocimiento de la respuesta inmune, con lo que aumenta la expresión de ligandos reconocidos por las células T (Kagnoff, 2007; Schuppan *et al.*, 2009).

### Influencia de la Dieta en la Microbiota

La influencia de la dieta en la composición de la microbiota se ha demostrado desde la lactancia. Los infantes alimentados al pecho tienen niveles más altos de *Bifidobacterium spp.*, mientras que en los bebés alimentados con fórmula

predominan *Bacteroides spp.*, con aumento de *Clostridium coccooides* y *Lactobacillus spp.* (Fallani *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2012).

Hasta hace poco se consideraba que, más allá del período postnatal, la microbiota llegaba a ser relativamente estable a lo largo de la vida; pero éste ha resultado un principio endeble. En un estudio realizado en ratones para ver la influencia de la dieta y la genética en la microbiota, aquellos con una dieta alta en grasa, no mostraron *Bifidobacterium spp.*, que protege la barrera intestinal. En general, la variación estructural de la microbiota es influida en un 57% por los cambios dietéticos y en menos del 12% por la carga genética (Zhang *et al.*, 2010). En un estudio muy reciente con cientos de gemelos homo y heterocigotos, se encontró que no todas las divisiones están asociadas a una genética dada, tal es el caso de Bacteroidetes (Goodrich *et al.*, 2014).

La “dieta occidental”, alta en azúcar y grasa, genera disbiosis afectando tanto el metabolismo del tracto gastrointestinal, como la homeostasis del sistema inmune (Sekirov *et al.*, 2010). Esto, se pudo comprobar en un modelo de ratones libres de gérmenes a los que se les trasplantó microbiota fecal de humanos adultos. Se les dio primeramente una dieta baja en grasa y rica en polisacáridos vegetales. Cuando se cambiaron a una dieta "occidental", la composición de la microbiota mostró un crecimiento excesivo de Firmicutes como *Clostridium innocuum*, *Eubacterium dolichum*, *Catenibacterium mitsuokai* y *Enterococcus spp.* (Turnbaugh *et al.*, 2009).

Walker *et al.* (2011), observaron que las dietas reducidas en carbohidratos favorecen un aumento del porcentaje de *Bacteroides vulgatus* en la microbiota intestinal enriquecida con bacterias de la división Bacteroidetes. Por su parte, las dietas restringidas en calorías previenen el crecimiento de *Clostridium coccooides*, *Lactobacillus spp.* y bifidobacterias, que son los principales productores de butirato, necesarios para la homeostasis de los colonocitos (Santacruz *et al.*, 2009). Las dietas ricas en carbohidratos complejos favorecen

menos el crecimiento de especies patógenas como *Mycobacterium avium* (subespecie para tuberculosis), que las dietas altas en grasa o proteína (Walker *et al.*, 2011).

Los carbohidratos tienen un efecto evidente sobre la microbiota; las dietas que los contienen en alta proporción, al mismo tiempo que incluyen baja ingestión de proteína y grasas animales, inducen enterotipo de *Prevotella* (Wu *et al.*, 2011). Los azúcares complejos aumentan los niveles de bifidobacterias, con especies benéficas como *B. longum*, *B. breve* y *B. thetaiotaomicron* (Pokusaeva *et al.*, 2011). Por otro lado, los azúcares refinados, median el crecimiento excesivo de bacterias oportunistas como *Clostridium difficile* y *C. perfringens*, aumentando la producción de bilis (Berg *et al.*, 2013; Begley *et al.*, 2006).

El consumo alto de fibra se asocia a *Prevotella* en el intestino humano (David *et al.*, 2014), lo que aumenta la producción de ácidos grasos de cadena corta, previniendo el crecimiento de algunas cepas de *E. coli* y otras enterobacterias (Zimmer *et al.*, 2012). En cambio, las dietas altas en proteínas y grasas saturadas, se asocian con el género *Bacteroides* (Wu *et al.*, 2011).

Comparando la microbiota entre niños europeos y los de zonas rurales en África, la microbiota de los primeros, es pobre en Bacteroidetes y alta en Enterobacteriaceae, a diferencia de los africanos. El hallazgo resulta curioso tomando en cuenta el nivel socioeconómico de las poblaciones, pues se esperaba una microbiota más equilibrada en la población caucásica. Este hecho se atribuye a la baja ingestión de fibra en los europeos (De Filippo *et al.*, 2010).

Mozes *et al.* (2008), realizaron un estudio en modelo murino donde se les alimentó con una dieta de leche condensada (44%) y aceite de maíz (8%). La dieta causó alteraciones microbianas específicas en la huella digital de la microbiota de las crías, tales como poblaciones enriquecidas de *Lactobacillus spp.* y *Enterococcus spp.* y empobrecidas en *Bacteroides spp.* y *Prevotella spp.*

Es necesario profundizar en los estudios sobre los efectos de la dieta en la microbiota, ya que este tipo de investigación es incipiente; el trabajo realizado confirma la estrecha relación entre dieta y microbiota.

### Modificaciones Dietéticas en DT1 y EC

El objetivo de la terapia nutricional en la DT1 es lograr y mantener un peso corporal estable, acorde a la complejión del paciente y los niveles de glucosa y lípidos sanguíneos, dentro del rango saludable.

Cada individuo debe tener un plan alimenticio acorde a sus características y necesidades (Wheeler *et al.*, 2012). Actualmente, no hay una dieta específica para los niños con DT1, sino que se deben seguir recomendaciones generales como las de American Heart Association en Estados Unidos. Se da prioridad a los carbohidratos complejos y a consumo balanceado de proteínas y se limita la ingestión de grasas, en especial de las saturadas. Además, se recomienda seguir un programa de ejercicio moderado previa asesoría con un especialista. La dieta de un paciente con DT1 y el estilo de vida debe corresponder a su estado metabólico y proporcionar la suficiente energía y nutrientes que aseguren un crecimiento y desarrollo adecuados (ADA, 2013).

A pesar de la recomendación general antes citada, a los niños con DT1 desde el diagnóstico, se les restringen alimentos con alto índice glicémico. Esto, en el afán de mantener su glicemia y para evitar más dosis de insulina, toda la dieta se modifica, pudiendo afectar el consumo de energía y nutrientes necesarios.

Analizando la dieta de niños y adolescentes con DT1, Randecker *et al.* (1996), encontraron una reducción sustantiva en la ingestión de azúcares simples y alimentos de alto índice glicémico. Su consumo total de proteína se aproxima a las recomendaciones. Sin embargo, es de destacarse que ingieren grasa saturada por encima de las recomendaciones y reducen el consumo de fibra.

En otros estudios, también se ha encontrado que los niños con DT1 consumen micro y macronutrientes en forma cercana a las recomendaciones nutrimentales, pero los lípidos totales rebasan la recomendación (Mayer-Davis *et al.*, 2006). En las investigaciones de Faulkner *et al.* (2006) y Helgeson *et al.* (2006), aunque los jóvenes con DT1 consumen menos carbohidratos que los saludables, su ingestión de grasa total y saturada es mayor. Esto implica un riesgo, por su propensión de los diabéticos, a enfermedades cardiovasculares.

Por su parte, para que un paciente celiaco tenga recuperación de la mucosa intestinal, requiere de una dieta estrictamente sin gluten durante toda su vida. Una vez que ha cesado el consumo de gluten debe haber mejoría de los síntomas, normalización de los anticuerpos específicos dentro de los 12 meses después de iniciar la dieta y recuperación a nivel histológico (Husby *et al.*, 2012). Sin embargo hay otros alimentos y nutrientes que también se omiten o reducen al enfocarse en la exclusión del trigo, cebada, centeno o avena (Ludvigsson *et al.*, 2013). Tal es el caso de la fibra dietética y de los micronutrientes con los que se fortifican las harinas de trigo comerciales.

Kautto *et al.* (2014), compararon la alimentación de niños celiacos de 13 años, diagnosticados en la primera infancia, con un grupo de niños sanos concordante en género y requerimientos nutricios. La mayoría de los niños con EC presentó un consumo de energía por encima del requerimiento nutricional promedio, independientemente del estado de la enfermedad. En el mismo estudio, los niños celiacos consumieron una dieta desbalanceada en cuanto a ingestión de grasas; fue alto el consumo de las saturadas y bajo el de las insaturadas.

## Efecto de Fármacos Usados en DT1 y EC sobre la Microbiota

En la DT1 es indispensable el tratamiento con insulina, la cual se prescribe de acuerdo a la forma en que el páncreas la libera en condiciones de salud. El páncreas secreta insulina en pequeñas dosis durante todo el día, incluso en los periodos de ayuno. Además hay una liberación rápida e intensa después de las comidas. Así, en la DT1, la insulina de efecto rápido es la que se prescribe para administrar antes de los alimentos, para evitar que se eleve la glucosa después de consumirlos. El otro tipo de insulina tiene efecto a lo largo del día y es para cubrir los periodos de ayuno. La forma de aplicar la insulina es por inyección en el tejido subcutáneo, para que ingrese directamente al torrente sanguíneo. De administrarse vía oral, pasaría por el proceso de digestión enzimática, ya que se trata de un péptido (Gillespie *et al.*, 2014). Así, no debe tener ningún efecto la insulina administrada exógenamente, sobre la microbiota intestinal.

Por otra parte, hay una fuerte correlación entre disbiosis de la microbiota intestinal inducida por antibióticos y DT1 (Keeney *et al.*, 2014; Mejía-León *et al.*, 2014). Se sabe que existe una disbiosis intestinal asociada a *Prevotella* y *Bacteroides* en DT1 (Murri *et al.*, 2013; Vaarala, 2012). De acuerdo con Jernberg *et al.* (2007), el tratamiento con clindamicina altera la proporción de Bacteroidetes en el intestino (con efectos a largo plazo). Sin embargo, también se ha encontrado que antibióticos como la vancomicina tienen un efecto protector contra la DT1 favoreciendo la propagación de la bacteria mucolítica *Akkermansia muciniphila* (Hansen *et al.*, 2012).

Para el tratamiento de la EC no se administra algún fármaco, sino que se trata con la sola restricción del gluten en la dieta. Sin embargo, debido a los síntomas principales en los niños antes del diagnóstico, es común que se les suministren antibióticos. Esto, además de que hay varios estudios que muestran fuerte asociación entre infecciones previas y su tratamiento con antibióticos, y el desencadenamiento de EC; por ejemplo, el uso de cefalosporina incrementa en



alto grado el riesgo (Canova *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2013). Así, el uso de antibióticos y las infecciones gastrointestinales en el primer año de vida, pueden facilitar el desarrollo temprano de EC debido a que alteran la microbiota intestinal y afectan la barrera en la mucosa (Canova *et al.*, 2014).

Además, debido a su naturaleza con síntomas gastrointestinales, en quienes padecen la EC, se desarrollan eventualmente crisis que requieren de fármacos orales. El impacto de los fármacos sobre la microbiota, las vellosidades en la mucosa intestinal y sus secuelas, se ha estudiado poco y los resultados no son contundentes (Tran *et al.*, 2013).

Obviamente los niños y adolescentes con DT1 y EC, reciben tratamientos con antibióticos al igual o en mayor medida que los que no padecen estas enfermedades. Las alteraciones en la microbiota intestinal por algunos fármacos, están bien tipificadas (Canova *et al.*, 2014; Jernberg *et al.*, 2007). El efecto de los antibióticos en la microbiota, puede permanecer hasta 2 años después de la exposición.

### Sistema Inmune, DT1 y EC

La respuesta inmune innata se adquiere desde el estado embrionario, independiente de la presencia de antígenos. Corresponde a las primeras reacciones de defensa del organismo, actúa de 0 a 12 h después del ingreso del antígeno extraño, para eliminarlo a través de mecanismos microbicidas y respuesta inflamatoria. Como no posee memoria, la respuesta ante un antígeno no se verá reforzada y siempre será la misma. Sin embargo, tiene la capacidad de alertar y dirigir la respuesta inmune adquirida hacia una respuesta celular o humoral específica (Abbas & Lichtman, 2008; Palomo, 2009).

Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas como los epitelios de la piel y las mucosas, enzimas y la microbiota

autóctona (O'Hara & Shanahan, 2006). También son componentes, los factores solubles, las células fagocíticas, tanto polimorfonucleares como mononucleares y células asesinas (Whiteside, 1997; Whiteside 2001). Aun cuando se considera inespecífico, el sistema innato es capaz de discriminar lo que es propio de lo ajeno y actuar rápidamente ante la invasión de agentes extraños (Collado, 2009).

La respuesta inmune posterior a la innata es la adaptativa. Su mecanismo se dirige a una porción del antígeno, llamada determinante antigénica o epítope y su intensidad aumenta ante contactos sucesivos. Los procesos de inmunidad adaptativa dependen tanto del antígeno como del hospedero. Dichos procesos pueden ser de tipo humoral, donde los linfocitos B tienen un papel predominante o de tipo celular, en el que los linfocitos T son las células fundamentales (Collado, 2009). La respuesta en ambos casos se inicia con la activación de los linfocitos en los órganos periféricos, por parte de la célula presentadora de antígeno (APC). Posterior a la activación, suceden las fases de reconocimiento, de activación y efectora (Collado 2009; Murphy *et al.*, 2009).

En la fase de reconocimiento, el antígeno se une con los receptores específicos que están en la membrana de los linfocitos maduros. Los linfocitos B se unen a moléculas, mientras que los T reconocen péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En la fase de activación, los linfocitos proliferan y se diferencian. En la proliferación, actúan los linfocitos T CD4, que activan linfocitos B y T CD8. En la diferenciación, se forman las células efectoras, que producen anticuerpos y citocinas y las de memoria (Murphy *et al.*, 2009). En la fase efectora, las células efectoras migran hacia el patógeno, mientras que los linfocitos B actúan en los órganos periféricos. Hay participación de células no linfoides, del sistema del complemento e inmunoglobulinas del tipo E. También intervienen citocinas segregadas por los linfocitos T, necesarios para estimular la inmunidad natural (Murphy *et al.*, 2009).

En el tracto gastrointestinal se localiza la mayor superficie mucosa del sistema inmune; es un órgano inmunológicamente privilegiado (Dwivedy & Aich, 2011; Van Wijk & Cheroutre, 2009). Su reto principal consiste en mantener el equilibrio entre absorción de nutrientes y de protección (Szcawinska-Poplonyk, 2012). De esto dependen tanto la nutrición como la capacidad de defensa. La mucosa intestinal está formada por una fase interna y otra externa. La fase interna es estéril y la constituyen los agentes secretados por las células de Goblet, mientras en la externa, se alojan las bacterias comensales (Aguirre *et al.*, 2012).

En la mucosa intestinal se encuentra el tejido linfoide asociado a intestino y las células efectoras. Este tejido linfoide está constituido por las placas de Peyer, los folículos linfoides aislados, el apéndice y los nódulos linfáticos mesentéricos. Las células efectoras se encuentran en la lámina propia con sus propios linfocitos y los intraepiteliales (Van Wijk & Cheroutre, 2009).

El epitelio intestinal, es una monocapa de células (enterocitos) estrechamente unidas por una zonula occludens constituida por occludina-1, E-cadherinas, cateninas, claudina-1, zonulina-1, JAM-1 y actina (Vaarala *et al.*, 2008). La capacidad de absorción de los enterocitos se ve aumentada gracias a las microvellosidades. Los enterocitos expresan MHC-I (Bozzola, 2003) y pueden actuar como células presentadoras de antígeno (Mayer *et al.*, 1991). La respuesta de los enterocitos es tolerogénica porque carece de los demás factores estimulantes (Mowat, 2003).

Las células dendríticas (CD) CD70+CX3CR1+ se prolongan hacia el epitelio intestinal, detectando antígenos de la luz intestinal y controlando el sistema adaptativo al inducir Th17, un tipo de células T colaboradoras (Rescigno & Di Sabatino, 2009). Éstas, son importantes en la defensa del hospedero contra bacterias y hongos (Dubin & Kools, 2008), pero en condiciones patológicas como la autoinmunidad, exacerban la inflamación (Steinman, 2008). Las placas

de Peyer se componen de áreas linfoides con células plasmáticas rodeadas por células T vírgenes (Tangye, 2011; Chorny *et al.*, 2010).

La respuesta adaptativa a nivel intestinal se caracteriza por la presencia de subtipos de células T y células plasmáticas (Van Wijk & Cheroutre, 2009). En la *lamina propria* pueden encontrarse todos los subtipos clásicos de células T, junto a una producción constitutiva estable de IL-17 (isoleucina-17, producida por las células Th17), ayudada por IL-6 y controlado por ácido retinoico (Mowat, 2003; Coombes & Powrie, 2008).

Al ser la DT1 una enfermedad autoinmune, las alteraciones en el sistema inmunitario son tomadas como indicadores, tanto para su diagnóstico, como para comprender la patogénesis. La aparición de uno o más auto-anticuerpos es uno de los primeros signos detectables de autoinmunidad celular emergente (Knip *et al.*, 2005). Estos son, anticuerpos anti-insulina, la isoforma 65 kDa de la decarboxilasa, los asociados a insulinoma (Colman *et al.*, 2002) y la proteína transportadora de zinc (Wenzlau *et al.*, 2007). No existe una edad límite para que se presente la autoinmunidad (Litherland, 2008; Orban *et al.*, 2009), que no se da inmediatamente antes de las manifestaciones clínicas, sino que puede perdurar desde pocos meses hasta varios años (Gillespie *et al.*, 2014).

A medida que avanza la DT1, las células  $\beta$  pancreáticas son atacadas por un infiltrado llamado insulitis. Éste, contiene citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, óxido nítrico, perforina, granzima B, el ligando inductor de apoptosis y las moléculas pro-apoptóticas (Manrique & Silva, 2006). La respuesta protectora de las células  $\beta$  ante las citocinas involucra – probablemente- la expresión de moléculas antioxidantes y el bloqueo de vías relacionadas con el óxido nítrico. Debido a la exposición crónica ante la insulitis, se genera un cambio homeostático a nivel endocrino y en el componente celular inmunológico, que finalmente destruye a las células  $\beta$ , induciendo los síntomas clínicos de la DT1 (Eizirik & Darville, 2001).

Por su parte, el detonante en la enfermedad celiaca es el gluten, sin embargo se requieren una suma de elementos para que se manifieste. En primer lugar se encuentra la predisposición genética, es necesario tener los haplotipos HLA-DQ2 o HLA-DQ8, esto aunado al ambiente inicial del proceso de reacción. La respuesta inmune de la EC tiene un componente innato, causante de la lesión epitelial, y otro adaptativo que es mediado por linfocitos T CD4+ específicos de la *lamina propria*, determinante en la remodelación mucosa (Arranz *et al.*, 2012).

En el contexto de las moléculas HLA-DQ2/DQ8, la activación de linfocitos T CD4+ de la *lamina propria*, genera, tras el reconocimiento de péptidos de gliadinas modificados por la transglutaminasa 2 (TG2), una respuesta inflamatoria. La inflamación en la EC se caracteriza por la presencia de citocinas del tipo Th1, donde prevalece el IFN- $\gamma$  y otras citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-15 e IL-18, pero hay ausencia de IL-12 y disminuye proporcionalmente la expresión de citocinas inmunorreguladoras como IL-10 y TGF $\beta$ . A consecuencia de la inflamación constante se produce una lesión en la mucosa intestinal que afecta la absorción de nutrientes. Según el grado de atrofia vellositaria las repercusiones clínicas y funcionales, así como la capacidad de recuperación, varían (Forsberg *et al.*, 2002; León *et al.*, 2006).

### Factores que Afectan la Permeabilidad Intestinal

La mucosa intestinal se compone de una barrera mecánica celular, uniones entre células, una barrera inmunológica, la flora bacteriana y el eje hígado-intestino. Dentro de los compuestos en la luz intestinal se encuentran alimentos, microorganismos y sus toxinas y secreciones que pueden producir daños a nivel local o sistémico. La modificación de alguno de sus elementos podría translocar bacterias o sus toxinas (Soriano & Guarner, 2003; Porras *et al.*, 2006).

Cuando la función de la barrera es deficiente hay un deterioro en la absorción de nutrientes, alteración de la respuesta inmune intestinal y aumento de la permeabilidad intestinal (Jiang *et al.*, 2003). Es importante mantener el equilibrio de la barrera intestinal por sus implicaciones en los procesos de regulación.

La permeabilidad intestinal se puede ver mermada por la presencia o ausencia de ciertos microorganismos, cambios en la alimentación y enfermedades crónicas. Según Cani *et al.* (2006), el control de la permeabilidad del intestino a través de la modulación selectiva de la microbiota intestinal por prebióticos, ayuda a proteger a los ratones ob/ob de enfermedades metabólicas. Este grupo reveló que los ratones alimentados con oligofruktosa tenían niveles más bajos de TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-1 $\alpha$ , IL6 e IFN- $\gamma$ , todos ellos promotores de la separación de las uniones estrechas. Además, se mostró que la alteración de la microbiota intestinal con aumento de *Bifidobacterium spp* mediante prebióticos, está ligada con una notable reducción de la permeabilidad intestinal.

Analizando el efecto de la dieta sobre la endotoxemia (respuesta inflamatoria exacerbada), Cani *et al.* (2008), observaron que una alimentación alta en grasa reduce la expresión de ocludina y zonulina, proteínas de unión estrecha, que ayudan a mantener intacta la permeabilidad del epitelio intestinal (Shen *et al.*, 2011).

En individuos con predisposición genética a DT1, Sapone *et al.* (2006) observaron un aumento en la expresión de zonulina que precedió al desarrollo de la enfermedad asociado al incremento en la permeabilidad intestinal. Por otro lado, en la investigación de Lee *et al.* (2010), también se encontró que en ratones NOD, la permeabilidad intestinal aumentó previo al desarrollo de la diabetes. De acuerdo con Vaarala (2012), la autoinmunidad puede activarse después de la translocación de microbios a través del epitelio intestinal como resultado de un aumento de la permeabilidad. Este hecho sugiere una relación entre este mecanismo de protección y la DT1.

Respecto a la EC, se ha encontrado que una sobreexpresión de zonulina y los autoanticuerpos séricos, se correlacionan con la permeabilidad intestinal aumentada (Vitoria & Bilbao, 2013).

### Planteamiento de la Pregunta de Investigación

En resumen, la microbiota de los niños con DT1 presenta mayor proporción de *Bacteroides* y menor de *Prevotella*, que la de los niños sanos. También en la microbiota de los niños con EC hay disbiosis que no se recupera por completo después de una evolución larga (1-2 años) y la enfermedad controlada. EC está controlada cuando no hay síntomas ni anticuerpos específicos positivos; DT1 se considera bajo control, cuando el diabético presenta hemoglobina glicosilada menor del 7.5% (Chiang *et al.*, 2014). En segundo término, se ha observado que *Prevotella* se relaciona con dietas ricas en carbohidratos, mientras que *Bacteroides* con aquéllas altas en proteína. Por último, los niños con DT1 o EC consumen menos carbohidratos y fibra dietética y más grasa, debido a cambios en la dieta.

De las premisas anteriores surge la pregunta: ¿La estructura de la microbiota intestinal en niños con DT1 o EC de larga evolución, es resultado de las modificaciones dietarias, o una consecuencia de la enfermedad?

## HIPÓTESIS

La relación *Prevotella* a *Bacteroides* en la microbiota intestinal es baja en niños con DT1 o EC y durante la evolución de la enfermedad, no regresa al equilibrio que presenta en la salud, debido a modificaciones en la dieta.

## OBJETIVOS

### General

Evaluar la relación entre *Prevotella* y *Bacteroides*, el estado nutricional y la dieta actual, de niños con diabetes tipo 1 o enfermedad celíaca con al menos un año de evolución.

### Particulares

Registrar historial clínico, tipificar haplotipos y cuantificar autoanticuerpos de niños con DT1 o EC con al menos un año de evolución y de niños sanos.

Evaluar antropometría y dieta en niños con DT1 o EC, con al menos un año de evolución, así como en niños sanos.

Extraer ADN<sub>g</sub> de las heces de niños con DT1 o EC y cuantificar por PCR en tiempo real, *Prevotella* y *Bacteroides*.

Buscar asociaciones entre nutrientes específicos y proporción *Prevotella* a *Bacteroides*, considerando el estado nutricional y el grado de control de la enfermedad.



## **PARTICIPANTES Y MÉTODOS**

Se invitó a participar en el estudio a niños con DT1 o EC con mínimo un año de evolución, que asistían a sus citas de control médico en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) o en la Clínica IMSS No. 14. Los controles fueron niños sanos del mismo rango etario, que tuvieran algún parentesco o fueran vecinos de los niños con DT1 o EC. Esto con la finalidad de que tanto este grupo de referencia como los niños diagnosticados tuviesen condiciones similares de vivienda y alimentación. Una vez firmada la carta de consentimiento por los padres, se les solicitaron datos generales, además se registró información de su historial clínico, así como de padres y abuelos, en un formato prediseñado en un estudio anterior de nuestro grupo de trabajo.

Los criterios de inclusión fueron diagnóstico de DT1 o EC con al menos un año de evolución y contar con al menos 7 años de edad, ya que la mayoría de los diagnósticos suceden entre los 7 y 12 años de edad. Los criterios de exclusión fueron, que no se firmara la carta de consentimiento informado, no se proporcionara la muestra de heces o sangre. Así mismo, que el participante estuviera enfermo al momento del muestreo o que hubiese recibido tratamiento con antibióticos en los últimos 2 meses.

### **Evaluación Antropométrica y de la Dieta**

El peso se midió con una balanza electrónica digital (capacidad de 0 a 150 kg  $\pm$  0.05 kg) y la talla con un estadiómetro Holtain, siguiendo técnicas estandarizadas (ISAK, 2001). Estos datos se ingresaron a los programas "Anthro" (WHO, 2010) y "Anthro plus" (WHO, 2009) para calcular el puntaje Z (cantidad de desviaciones estándar de un dato respecto a la media) de

los indicadores de crecimiento. Estos fueron, talla para la edad (T/E), peso para la talla (P/T), peso para la edad (P/E) e índice de masa corporal para la edad (IMC/E). Este último se calcula dividiendo el peso corporal en kilos, entre el cuadrado de la talla en metros ( $\text{kg/m}^2$ ) (WHO, 1995). La interpretación del valor de los indicadores de crecimiento, se realizó de acuerdo a los puntos de corte establecidos por la Organización Mundial de la salud (WHO, 2009).

Para conocer la dieta actual de los participantes, se aplicó un recordatorio de 24 h en dos periodos. Se utilizaron modelos de alimentos en plástico y en gráficos impresos, así como utensilios de cocina para estimar la cantidad de alimento consumido. Los nutrientes de interés fueron carbohidratos, fibra, proteínas y grasas saturadas e insaturadas. La información obtenida, se analizó a través de un diccionario de composición de alimentos regionales (Ortega *et al.*, 1999).

#### Colección de Muestras y Extracción de ADN Genómico

A cada niño se le tomó una muestra de sangre venosa, en tubos con anticoagulante, que se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis. También, se les solicitó que colectaran una muestra de heces del mismo día, la cual se colocó inmediatamente en hielo para transportarla al CIAD para la extracción de ADN genómico (ADNg). El procedimiento de extracción se realizó en las primeras 4 h después de coleccionar las muestras de heces.

Se extrajo el ADNg a partir de la muestra de sangre completa usando el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción del ADNg de heces, se usó el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania), y de la misma forma, se siguieron las instrucciones del proveedor. La concentración y pureza de los extractos se evaluó midiendo absorbancia a 260/280 nm, en un espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). El ADNg extraído se almacenó a -20 °C.

## Tipificación de Haplotipos

Se amplificaron los alelos DQA1\*0501, DQA1\*0301, DQB1\*0201, DQB1\*0302/3, por PCR en tiempo real (qPCR). Para esto se utilizaron iniciadores específicos previamente diseñados para los alelos (Olerup *et al.*, 1993). La Tabla 1 muestra las secuencias de los iniciadores utilizados.

**Tabla 1. Iniciadores utilizados en la tipificación de haplotipos**

Iniciador	Dirección	Secuencia	Tamaño
DQA1*0501	Sentido	5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTA3'	186 pb
	Antisentido	5'AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC3'	
DQA1*0301	Sentido	5'TTCACTCGTCAGCTGACCAT3'	183 pb
	Antisentido	5'CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT3	
DQB1*0201	Sentido	5'GTGCGTCTTGTGAGCAGAAG3'	205 pb
	Antisentido	5'GCAAGGTCGTGCGGAGCT3'	
DQB1*0302/0303	Sentido	5'GACGGAGCGCGTGCGTTA3'	122 pb
	Antisentido	5'AGTACTCGGCGTCAGGCG3'	

Adaptado de Olerup *et al.* (1993)

Cada reacción de PCR contenía: 12.5 µL de SYBR-Green® mix, 0.5 µL de cada uno de los iniciadores correspondientes a cada bacteria y 11.5 µL del templado de ADN<sub>g</sub> con 50 ng/µL de concentración, para un volumen final de 25 µL. Se utilizó un termociclador de 96 pozos StepOnePlus™ Instrument (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA).

### PCR en Tiempo Real para Cuantificar *Prevotella* y *Bacteroides*

La curva estándar por qPCR se construyó usando muestras de ADN<sub>g</sub> extraído de heces, analizadas previamente por pirosecuenciación, con acumulación de *Prevotella* y *Bacteroides* conocida (Mejía-León *et al.*, 2014). Las muestras

fueron C1 con 9% de acumulación relativa de *Prevotella* y 16.7% de *Bacteroides*, C2 con 50% de acumulación relativa de *Prevotella* y 7.2% de *Bacteroides* y C3 con 63% de acumulación relativa de *Bacteroides* y 0% de *Prevotella*. Para dicha curva de calibración se realizaron diez diluciones seriadas 106.5 µg/µL – 0.01065 µg/µL para *Prevotella* y 40.5 µg/µL – 0.00405 µg/µL para *Bacteroides*.

Las reacciones para la cuantificación se realizaron usando iniciadores de *Prevotella* y *Bacteroides* previamente diseñados (Bekele *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2008). Para cada reacción se utilizaron 12.5 µL de IQ™ SYBR-Green® supermix (BIO-RAD, Hercules, CA, USA), 0.5 µL de cada uno de los iniciadores sentido y antisentido correspondientes a cada bacteria y 11.5 µL del templado de ADNg con 50 ng/µL de concentración, dando un total de 25 µL por reacción. Se utilizó un equipo termociclador de 96 pozos StepOnePlus™ Instrument (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). Las condiciones de las reacciones se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones óptimas para el alineamiento, extensión y amplificación en la cuantificación de *Prevotella* y *Bacteroides***

<b>Fase</b>	<b><i>Prevotella</i></b>	<b><i>Bacteroides</i></b>
Iniciación	95 °C 5 mi n	95 °C 5 min
Desnaturalización	95 °C 30 seg	95 °C 30 seg
Alineamiento	60 °C 30 seg	60 °C 30 seg
Elongación	72 °C 30 seg	72 °C 30 seg
Ciclos	30	30
Conservación	4 °C	4 °C

Como control interno se corrió una muestra previamente pirosecuenciada. En la Tabla 3 se observa la secuencia y longitud de los iniciadores utilizados en la cuantificación de *Prevotella* y *Bacteroides*.

**Tabla 3. Secuencias de iniciadores utilizados para *Prevotella* y *Bacteroides***

<b>Grupo</b>	<b>Dirección</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño</b>
<i>Prevotella</i>	Sentido	GGTTCTGAGAGGAAGGTCCCC	121 pb
	Antisentido	TCCTGCACGCTACTTGGCTG	
<i>Bacteroides</i>	Sentido	GAGAGGAAGGTCCCCAC	106 pb
	Antisentido	CGCTACTTGGCTGGTTCAG	

Adaptado de Bekele *et al.*, 2010 y Guo *et al.*, 2008.

### Análisis de Datos

Debido al tamaño tan pequeño de los grupos y su variabilidad, no fue posible aplicar un análisis estadístico. Así, el análisis es discursivo, apoyado en información publicada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Participantes en el Estudio

En total, participaron 23 niños y adolescentes entre 2 y 18 años de edad, de los cuales se incluyeron 19 (7 con DT1, 4 con EC y 8 para el grupo de referencia). Aunque uno de los criterios de inclusión era una edad mayor de 7 años, se incluyeron dos niños menores (2 y 3 años), debido a que ya estaban siendo atendidos en el Laboratorio de Proteínas por padecer EC.

En la Tabla 4 se observan las características de los 7 niños del grupo de DT1. De éstos, 5 presentaron auto-anticuerpos contra glutamato decarboxilasa (GAD) y/o contra tirosina fosfatasas (IA-2), lo que indica que son diabéticos tipo 1A. Los 2 restantes no presentaron evidencia de autoinmunidad, lo que los hace diabéticos tipo 1B (Prieto *et al.*, 2012). Cabrera Rodé (2010), encontró que en población cubana con DT1, la frecuencia de anticuerpos a GAD fue del 50 al 80% y la de los anticuerpos contra IA2 fue del 50 al 75%.

En nuestro grupo de estudio, sólo un niño con DT1, el caso D2, resultó positivo para auto-anticuerpos contra transglutaminasa tisular, específicos de EC, aunque sin síntomas. Así, es probable que este caso sea parte del 10% de diabéticos que eventualmente desarrollan EC (Rewers *et al.*, 2004).

En todos los casos del grupo con DT1, excepto D5, se presentaron haplotipos o sus alelos de predisposición. El haplotipo HLA-DQ8 (3 casos) fue más común que el DQ2 (un caso), mientras que el resto presentó sólo uno de los alelos (B1\*0501 o A1\*0301).

**Tabla 4. Características de participantes del grupo con diabetes tipo 1**

Caso	Edad (años)	HLA-DQ2		HLA-DQ8		<sup>1</sup> Anti-cuerpos GAD/IA2	Hb glicosilada
		A1 *0201	B1 *0501	A1 *0301	B1 *0302/3		
D1	14		+	+	+	-	< 8%
<sup>2</sup> D2	14	+	+			+	> 8%
D3	11		+	+		+	> 8%
D4	13		+	+	+	+	> 8%
D5	15					-/+	< 8%
D6	13			+	+	-/+	< 8%
D7	15			+		-	< 8%

<sup>1</sup>Autoanticuerpos contra glutamato decarboxilasa (GAD) y tirosina fosfatasa (IA2).

<sup>2</sup>Presentó anticuerpos IgA contra transglutaminasa tisular (TGt).

El puntaje Z IMC/Edad de los participantes con DT1, osciló entre -1.45 y 1.45. Dos de ellos tenían bajo peso (-1.45 y -1.25), dos mostraban normopeso (0.02 y 0.52) y tres presentaron sobrepeso (1.24, 1.35 y 1.45).

Para determinar si existía un manejo adecuado y buen control de la DT1 se tomó el último valor de hemoglobina glicosilada registrado en el historial médico y proporcionado por los padres. Los participantes D2, D3 y D4, no tenían la DT1 controlada (Tabla 4). De acuerdo con la American Diabetes Association la recomendación general para jóvenes menores de 18 años con DT1, es tener un valor de hemoglobina glicosilada menor al 8%. No obstante este criterio, la ADA también sostiene que el control glicémico debe ajustarse a las características de cada persona, considerando edad, tiempo de evolución de la enfermedad y la presencia de alguna comorbilidad (Chiang *et al.*, 2014).

Las características del grupo de EC, se muestran en la Tabla 5. Todos los niños presentaron al menos un alelo de los analizados para haplotipos HLA-DQ2 o DQ8 de predisposición a EC, de acuerdo con los criterios de la ESPHAGAN (Husby *et al.*, 2012). El caso EC1 presenta el haplotipo HLA-DQ2 y el C2 el

HLA-DQ8. En este grupo, el alelo DQB1\*302 predominó, presentándose en 3 de los 4 participantes, lo que es común, en población celiaca sonorense al igual que el alelo DQA1\*0301 (Mejía-León *et al.*, 2014; Sotelo Cruz *et al.*, 2013). Le siguieron los alelos A1\*0201 y B1\*0501 en dos casos y finalmente el A1\*0301, en uno. Curiosamente, el alelo B1\*0302 es el de menor frecuencia en la población de neonatos sonorenses saludables (Ruiz-Dick, 2012).

**Tabla 5. Características de participantes del grupo con enfermedad celiaca**

Caso	Edad (años)	HLA-DQ2		HLA-DQ8		<sup>1</sup> Anticuerpos IgA	
		A1*0201	B1*0501	A1*0301	B1*0302/3	Gd	TGt
EC1	8	+	+			-	-
EC2	10	+		+	+	+	+
EC3	2				+	+	+
EC4	3		+		+	+	+

<sup>1</sup>Anticuerpos IgA contra gliadinas (Gd) y contra transglutaminasa tisular (TGt).

En la EC controlada desaparecen los anticuerpos específicos contra gliadinas y los auto-anticuerpos contra transglutaminasa, que en la enfermedad activa son positivos, además de desaparecer los síntomas gastrointestinales. Del grupo de niños con EC, los casos EC1 y EC2 proporcionaron muestra de sangre actual, el primero dio negativo a anticuerpos anti-gliadinas y anti-transglutaminasa. El segundo caso presentó anticuerpos positivos, debido posiblemente a la alteración ocasionada por una intervención quirúrgica reciente, ya que después de estos procesos al paciente se le suministran dosis altas de antibióticos los cuales modifican la microbiota intestinal (Canova *et al.*, 2014; Jernberg *et al.*, 2007) (Tabla 5). En los casos EC3 y EC4, los valores de anticuerpos fueron los registrados en nuestro laboratorio, cuando tenían la enfermedad activa. En resumen, se considera que los niños con EC no tenían la enfermedad controlada, excepto el caso EC1.



Los pacientes celíacos de nuestro estudio tuvieron un puntaje Z IMC/Edad entre -1.54 y 1.52, lo que ubica a uno de ellos en desnutrición (-1.54) y a los otros tres con sobrepeso. De acuerdo a Reilly *et al.* (2011), el apego o desapego a una dieta libre de gluten llega a modificar el IMC debido a que cuando se sienten mejor, aumentan su actividad física. Otro factor pueden ser las restricciones dietarias –que pueden incurrir en un desbalance- y a una estrecha vigilancia nutricional. En nuestro caso, se hace evidente la influencia que tiene la supervisión paterna sobre la adherencia a la dieta. Los participantes de este grupo que no se mantienen controlados, tienen 8 y 2 años y por lo tanto no son responsables de planear su régimen.

Se puede observar una evidente heterogeneidad entre los participantes del grupo de EC. El caso EC2 se sometió recientemente a cirugía por problemas de reflujo, debido a esto se modificó su respuesta fisiopatológica y eso lo hace muy diferente para fines de agrupación. Los casos EC3 y EC4 son niños de mucha menor edad que el resto del grupo. Considerando que durante los primeros años de vida la microbiota sufre cambios rápidos y radicales (Fouhy *et al.*, 2012), no es comparable con los otros, mayores de 7 años (Mariat *et al.*, 2009).

Así, en el grupo de EC, el tamaño de la muestra, el rango etario y las observaciones particulares anteriormente mencionadas, impiden el analizarlos como grupo.

En la Tabla 6 se observan las características de los participantes en el grupo saludable, el cual es el de referencia en este estudio. Todos los niños de este grupo presentaron haplotipos o sus alelos de predisposición a EC y a DT1. Aunque en la población sonorensis, un 30% presenta los haplotipos de riesgo (Ruiz-Dyck, 2012), en el grupo de referencia la mayoría los tiene ya que son hermanos o parientes cercanos de los niños en estudio; esto, para tener condiciones ambientales similares para fines comparativos.

**Tabla 6. Características de participantes en el grupo control**

Caso	Edad (años)	Alelos positivos DQ				<sup>1</sup> Anti-cuerpos	<sup>2</sup> IgA
		A1*0201	B1*0501	A1*0301	B1*0302/3	GAD/IA2	TGt
S1	11	+				—	—
S2	9	+		+	+	—	—
S3	13	+				—	—
S4	9	+	+			—	—
S5	16	+		+	+	—	—
S6	14	+				—	—
S7	12	+				—	—
S8	16		+		+	—	—

<sup>1</sup>Autoanticuerpos contra glutamato decarboxilasa (GAD) y tirosina fosfatasa (IA2).

<sup>2</sup>Anticuerpos IgA contra transglutaminasa tisular (TGt).

La edad de los niños del grupo saludable osciló entre los 9 y 16 años, considerándose a todos de pre-adolescentes a adolescentes (Tabla 6). Los 8 participantes del grupo de referencia resultaron negativos para anticuerpos contra GAD e IA2 y también contra transglutaminasa tisular. Por ello, se pueden considerar libres de EC o DT1.

En la evaluación del puntaje Z IMC/Edad en el grupo de referencia, un participante se encontró en desnutrición (-2.08). Tres casos estaban en normopeso (0.57, 0.73 y 0.97), dos casos mostraron sobrepeso (1.24 y 1.96) y dos participantes presentaron obesidad (2.4 y 2.5).

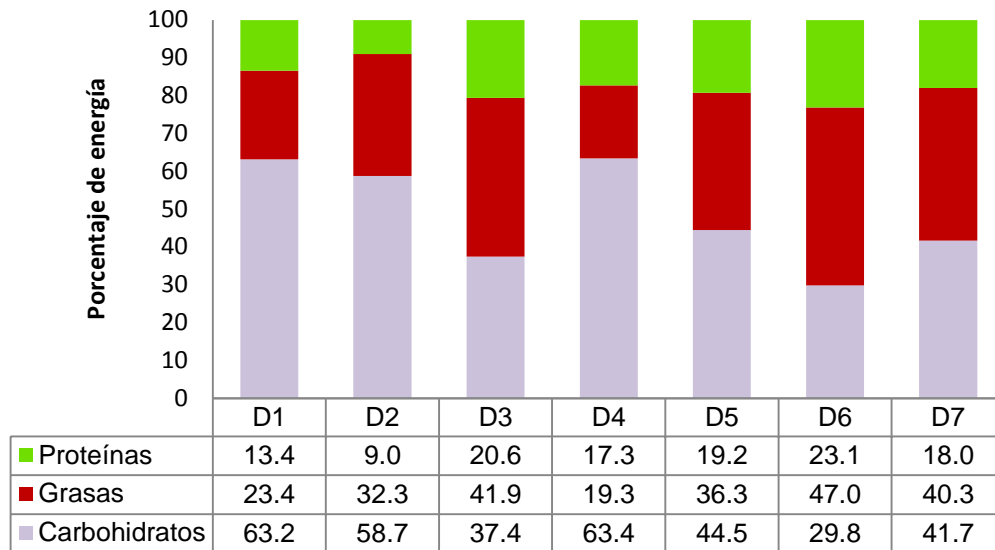
La predisposición genética es indispensable para el desarrollo de DT1 y EC, aunque no es suficiente. En la totalidad de participantes iniciales de este estudio, los 4 alelos analizados se presentaron en proporción similar, siendo los B1\*0501 y A1\*0301 los más comunes para DT1 y el B1\*0302/3 el más común en EC. En la investigación de Parada *et al.* (2011), de población amerindia, encontraron que en EC el alelo más frecuentes fue B1\*0201 con un 55%, al

igual que en un grupo de celíacos sonorenses (Sotelo Cruz *et al.*, 2013). En la población amerindia saludable, es prevalente el haplotipo HLA-DQ8 en un 36%, mientras en población sonorense solo se presentan en alrededor del 15% (Ruiz-Dyck, 2012).

### Composición de la Dieta

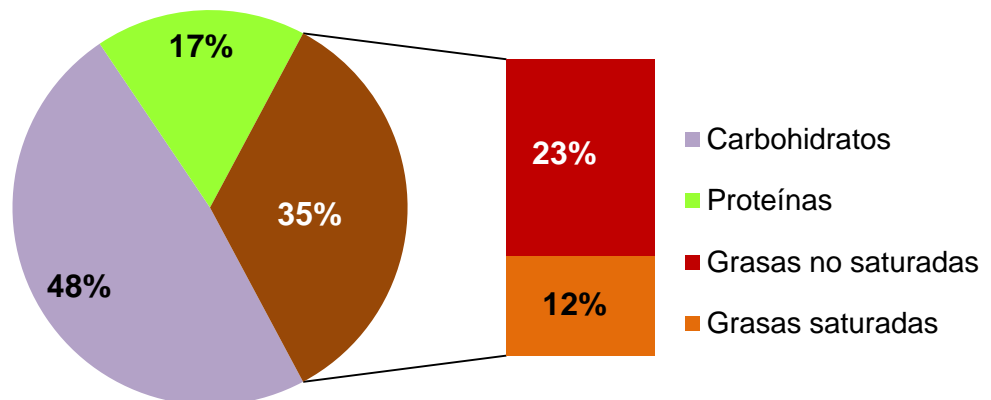
La evaluación de la dieta del grupo con DT1 se muestra en la Figura 1 y la adecuación se comenta de acuerdo a las recomendaciones para niños mexicanos, de Bourges *et al.* (2008). La contribución de carbohidratos al aporte de la energía total consumida, que debe de ser entre 55 y 65%, varió en un rango amplio de 30 a 65%, con un promedio de 48%. En dos de los niños la contribución de los carbohidratos fue 63%, uno de ellos presentó 58% y cuatro consumieron entre 30% y 44%. En cuanto al aporte de energía proveniente de lípidos, solo dos participantes se encontraron cerca de la recomendación (25-30%); uno consumió mucho menos de lo recomendado (19.3%) y en cuatro casos, la ingestión fue muy alta (36-47%). Respecto a la energía proveniente de proteínas, recomendada entre 12 y 15%, en un niño la ingestión fue muy baja (9%) y solo un niño tuvo una ingestión adecuada. Cinco niños consumieron proteína en exceso (17, 18, 19, 21 y 23%).

De acuerdo con O´Brecht *et al.* (2013), más de la mitad de los jóvenes con DT1 consumen un exceso de calorías en forma de grasa. Esto, va unido a la ingestión de más de la recomendación (WHO, 2010) de grasas saturadas (7%), problema que se correlaciona positivamente con la cantidad de hemoglobina glicosilada. Más de la mitad de los niños con DT1 del presente estudio, consumieron grasas en exceso y en promedio 11% de grasas saturadas, coincidiendo con lo encontrado por otros autores en niños con DT1 (O´Brecht *et al.*, 2013; Snell-Bergeon, 2009).



**Figura 1. Aporte de los nutrientes a la energía consumida por los participantes en el grupo de diabéticos tipo 1.**

La Figura 2 muestra el promedio de energía derivada de macronutrientes en los niños con DT1, para observar el patrón de consumo como grupo. Un 48% de la energía corresponde a carbohidratos, 34% a los lípidos, de los cuales el 12% son grasas saturadas y finalmente el 17% a proteínas. En promedio el aporte de los macronutrientes a la energía total, está fuera de la recomendación, con reducción sustantiva de carbohidratos y exceso de lípidos y proteínas.



**Figura 2. Promedio del aporte energético de macronutrientes en la dieta del grupo de diabéticos tipo 1.**

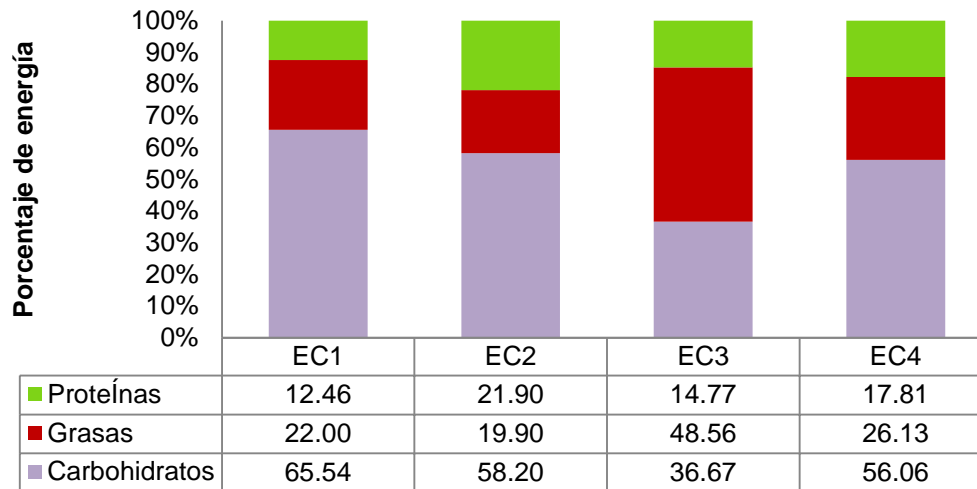
En el control de la diabetes, es fundamental para la planeación y la adherencia a la dieta, que el niño y su familia tengan buena información sobre la dieta. Gellar *et al.* (2007), encontraron en un estudio cualitativo, que un grupo de niños con DT1 entre 7 y 16 años, tenían un consumo adecuado de frutas, verduras y alimentos bajos en grasa. No obstante el aparente equilibrio dietario, consideraban que alimentos como el tocino, queso y carne –altos colesterol y grasas saturadas- eran buenas opciones dentro de su régimen, porque no proveen carbohidratos. De acuerdo con el patrón alimentario observado, la preferencia por alimentos altos en grasa sugiere que los niños con DT1 de nuestro estudio abusan de este tipo de alimentos.

La fibra es una de las principales fuentes energéticas para la microbiota intestinal (Yang *et al.*, 2013), además de su contribución a la reducción del índice glicémico de los alimentos. Por esto, un punto analizado particularmente en este estudio, fue la ingestión de fibra dietética. El rango en general varió de los 4 a los 56 g/día, con un promedio de 28.6 g/día, por debajo de los 31 g/día recomendados para niños de 9 o más años (Institute of Medicine, 2005). En la dieta de los niños diabéticos, la mayor parte de la fibra provenía de panes y cereales integrales.

Exceptuando la necesaria restricción de gluten, las recomendaciones nutrimentales en cuanto a las fuentes de energía, para los niños y jóvenes con EC, son las mismas que para niños saludables.

Durante la investigación, participaron 4 niños con EC, cuyos datos presentaron mucha variabilidad. En la Figura 3 se muestra el análisis individual de la energía obtenida de macronutrientes. Tres de los cuatro participantes consumieron carbohidratos de acuerdo a la recomendación (Bourges *et al.*, 2008), mientras el caso EC3 tuvo una ingestión muy baja. En los lípidos, solo un participante estuvo dentro del rango recomendado, dos participantes estuvieron por debajo del mismo y nuevamente el caso EC3 se distinguió, esta vez por un consumo superior al límite recomendado, con un 49%. En cuanto a las proteínas como

fuente energética en la dieta, dos de los participantes consumieron cantidades dentro de lo recomendado, y dos se excedieron (Bourges *et al.*, 2008).



**Figura 3. Aporte de los nutrimentos a la energía consumida por los participantes en el grupo con enfermedad celiaca.**

Al tener que omitir el gluten en su alimentación, los niños con la condición celiaca sustituyen el pan y las tortillas de trigo por otros productos, principalmente de maíz.

Dentro de las limitantes en el análisis dietario realizado a los participantes con EC, se observó que la alimentación del grupo es variada entre sus miembros. Dos casos consumían carbohidratos refinados en postres; en los otros dos, los padres ejercían un mayor control de sus dietas. Errichiello *et al.* (2010) y Kurppa *et al.* (2012), afirman que el buen cumplimiento de la dieta, en niños, depende de la conciencia familiar sobre la enfermedad, pero en la adolescencia suele romperse el régimen indicado. Los casos de este estudio con mayor descontrol en las dietas, fueron niños de 8 y 2 años.

Diamanti *et al.* (2014), hacen hincapié en la importancia de mantener el equilibrio en la dieta en EC, pues a largo plazo se evidencian deficiencias en

nutrientes. El desbalance, puede ser por aumento de los macronutrientes para compensar la ausencia del gluten o a una disminución de la ingestión calórica, debido al seguimiento estricto de la dieta (Reilly *et al.*, 2011).

En cuanto al consumo de fibra dietética en los participantes celíacos, dos niños – de 3 y 8 años- consumen, en promedio, más de 30 g/día, superando la recomendación de 25 g/día; mientras que el participante de 10 años rebasa los 31 g/d de fibra sugeridos para su edad. El caso de 2 años registró 12 g/día de fibra, quedando por debajo de la recomendación de acuerdo a su edad, de 19 g/día de fibra total para niños de 1 a 3 años (Institute of Medicine, 2005).

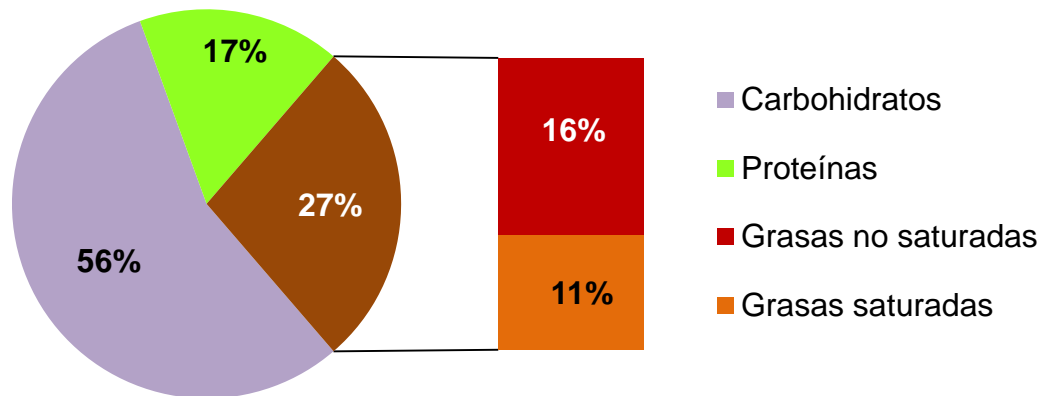
La distribución de nutrientes de cada uno de los participantes del grupo de referencia se muestra en la Figura 4. En el análisis individual se observa que 5 de los 8 participantes consumen energía proveniente de carbohidratos en un porcentaje cercano a las recomendaciones (Bourges *et al.*, 2008). Dos niños tuvieron una ingestión menor a lo recomendado con 38% y 49% y uno consumía 70% de su energía total a partir de carbohidratos; el resto, cumple la recomendación. Analizando el aporte de energía a partir de lípidos, se encontró que hubo tres participantes con dietas extremas, dos con un aporte muy bajo, de 17 y 20% y uno que excedió (45%) la recomendación (25-30%). Dos niños consumieron menos de lo recomendado (12-15%) de proteínas, tres estuvieron dentro del rango y tres de ellos superaron la recomendación, uno incluso alcanzó un 31%.



**Figura 4. Aporte de los nutrimentos a la energía consumida por los participantes en el grupo de niños saludables, de referencia.**

El promedio del aporte de los nutrientes a la energía consumida dentro de la dieta del grupo de referencia, se ilustra en la Figura 5. El promedio de energía proveniente de carbohidratos fue de 56% y de lípidos 27%, 11% de estos correspondieron a grasas saturadas. Aunque en el análisis individual los registros indican un consumo muy variado que va del 10% al 31% de energía derivada de proteínas como grupo, fue de 17%. Los promedios, excepto por proteína un tanto mayor a la recomendación, estuvieron dentro de lo recomendado. Los jóvenes sonorenses tienden a un consumo alto de proteína (Palacios-Esquer *et al.*, 2011), en población adolescente sonoreNSE. En ambos casos los participantes realizaron la mayoría de sus comidas en casa.





**Figura 5. Promedio del aporte energético de macronutrientes en la dieta del grupo control.**

Analizando el consumo de fibra en el grupo control, niños y niñas mayores de 9 años, cinco consumieron menos de la recomendación mínima, variando entre 14 y 22 g/día, mientras que los restantes tuvieron una ingestión entre 28 y 32 g/día, acorde a la recomendación.

El análisis dietario muestra que en los tres grupos se consume gran cantidad, frecuentemente un exceso, de alimentos de origen animal -fuentes de grasa saturada-. Se registraron valores extremos en la fibra ingerida, el valor promedio de consumo estuvo ligeramente por debajo de lo recomendado, siendo la fuente principal los productos integrales y frijoles para los niños de los grupos DT1 y saludables, y la tortilla de maíz en el grupo de EC.

La ingestión de proteínas no presenta variación entre el grupo DT1, respecto al grupo sano, pero sí se observa una reducción de carbohidratos totales (48 vs 56%) y un aumento notable en la ingestión de grasa (35 vs 27). Esto, es similar a lo observado en estudios de niños y jóvenes con DT1 de otras poblaciones del mundo (Faulkner *et al.*, 2006; Helgeson *et al.*, 2006).

Tomando como referencia a Valencia *et al.* (1998), los niños de este estudio se apegan a la dieta sonoreña, con alta proporción de grasas de origen animal y buen consumo de leguminosas, como fuente de fibra. Si bien, los alimentos considerados típicos continúan vigentes, la población juvenil –como la de nuestra investigación– representa un potencial para incorporar las llamadas comidas rápidas a su dieta, debido a la disponibilidad comercial (Sandoval & Camarena, 2011).

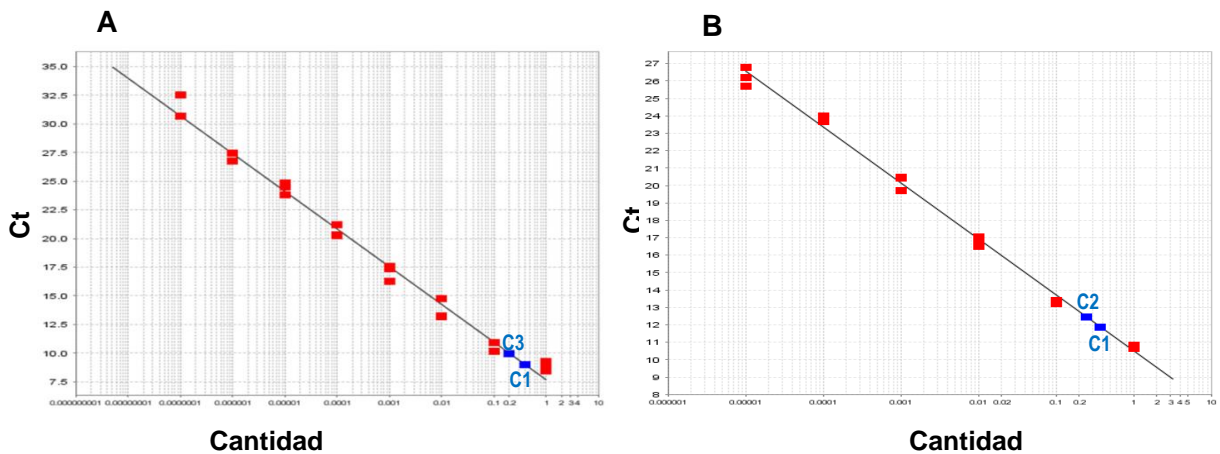
### Microbiota Fecal

Uno de los objetivos de esta investigación de tesis fue conocer la acumulación de *Prevotella* y *Bacteroides* en muestras de heces de los participantes, como un acercamiento a la composición de la microbiota. Esto porque en un estudio previo (Mejía-León *et al.*, 2014) se evidenció que son los géneros dominantes (más del 50% del total) en una muestra de niños de la misma población de este trabajo. Así, a los niños de los 3 grupos participantes, pacientes diabéticos, pacientes celíacos y niños sanos, se les solicitó una muestra de heces fresca para la extracción de ADN genómico (ADNg) y su posterior análisis.

Las muestras analizadas en este estudio provienen de un total de 19 niños, 7 en el grupo de DT1 con al menos un año de evolución, 4 en el grupo de EC con al menos un año de evolución y 8 en el grupo de referencia. Las muestras de heces las colectaron los padres en el hogar y se transportaron a 4 °C al CIAD para la extracción de ADNg. Una vez obtenido éste, se realizó la cuantificación de *Prevotella* y *Bacteroides* mediante PCR cuantitativo (qPCR), usando iniciadores específicos, descritos en la sección de Participantes y Métodos.

Para validar la técnica, se hicieron curvas de calibración interna de *Prevotella* y *Bacteroides*, con muestras de ADNg obtenido de heces y previamente pirosecuenciado y con una acumulación conocida de dichas bacterias (Mejía-León *et al.*, 2014). Las curvas de calibración interna ofrecen la ventaja de una cuantificación absoluta de la expresión genética (Swillens *et al.*, 2004).

La Figura 6 (A y B), muestra las curvas de calibración obtenidas, graficando cantidad en el eje de las X y el número de ciclos necesarios para que se produzca una señal de fluorescencia y se dé la amplificación, llamado umbral de ciclos (Threshold Cycle) (Ct), en el eje Y.



**Figura 6. Curvas estándar de iniciadores de *Prevotella* (A) y *Bacteroides* (B) y posición de muestras (C1, C2 y C3) de abundancia conocida, como referencias.**

En las gráficas de la Figura 6, se puede identificar fácilmente a dos muestras de abundancia conocida corridas como controles internos (en color azul). Una de las muestras (C1) presentaba 5.9% de acumulación relativa de *Prevotella* y 16.7% de *Bacteroides*, por pirosecuenciación. En este estudio, mediante qPCR, se obtuvo 9.9% de *Prevotella* y 15.5% de *Bacteroides*. Se corrió una muestra (C2) con 50% de acumulación relativa de *Prevotella* y 7.2% de *Bacteroides* y otra muestra (C3), con 63% de acumulación relativa de *Bacteroides* y 0% de *Prevotella*. Mediante el qPCR, en la muestra C2, usada para acumulación alta de *Prevotella*, se obtuvo 19.9%. Finalmente, en este análisis en la muestra C3, usada en la curva de *Bacteroides*, se obtuvo 23.9%.

Para la muestra C1, las discrepancias entre las acumulaciones calculadas por pirosecuenciación y las obtenidas en este estudio, fueron menores tanto para *Prevotella* como para *Bacteroides*. Sin embargo, en las muestras C2 y C3, usadas para ejemplificar acumulación de 50% o más de *Prevotella* y de

*Bacteroides*, respectivamente, se encontró gran desviación entre los resultados obtenidos por qPCR y pirosecuenciación. En ambos casos, se subcuantificó por qPCR en poco más de la mitad. Las diferencias en el análisis, pueden atribuirse a una cobertura parcial o inespecífica de los iniciadores si estos se unen a secuencias parcialmente complementarias presentes en el DNA.

En el caso de la muestra C2, la subcuantificación puede atribuirse a que el iniciador utilizado (g-Prevo) - aunque tiene 98% de alineación con *Prevotella* - identifica solamente a 12,054 secuencias (The Ribosomal Database Project, 2014) y así no cubriría el total de secuencias de *Prevotella* acumuladas en la pirosecuenciación.

Para la muestra C3, si bien, el iniciador Bacter identifica 94,655 secuencias, se alinea sólo en un 54.4% con *Bacteroides* y 35.6% con *Prevotella* (The Ribosomal Database Project, 2014). Esto, le resta especificidad y la estimación de acumulación dependerá de la proporción de *Prevotella* en la misma muestra. Así, en la muestra C3 al no haber *Prevotella*, el porcentaje de *Bacteroides* fue subcuantificado por qPCR. Curiosamente, el problema no se hace obvio en la muestra C1 debido a sus bajas proporciones de ambas bacterias en estudio.

Otro aspecto a considerar para responder a las diferencias de acumulación encontradas entre ambos métodos, aunque se desconoce su ponderación, es la forma en que se calcula la abundancia relativa. En el qPCR se evalúa totalmente cada bacteria individualmente, mientras que en la pirosecuenciación la abundancia se calcula basada en el número de secuencias por grupo filogenético, como parte del total (Van den Bogert *et al.*, 2011).

Para evaluar la acumulación de *Prevotella* se estimó su proporción tomando como referencia el 60.2% de diferencia obtenido por qPCR, debido a la reducida cobertura de secuencias por parte de g-Prevo. El resultado se multiplicó por un factor de corrección de 0.98, así se contemplaba el 98% de

alineación de g-Prevo con las secuencias del género de *Prevotella*. La proporción de *Bacteroides*, se estimó usando como referencia el 62.1% de discrepancia detectado. Después, se multiplicó la abundancia obtenida por un factor de corrección de 0.544, correspondiendo al 54.4% de alineación de Bacter con las secuencias del género *Bacteroides*. En las muestras de *Bacteroides* con presencia de *Prevotella* se restó el 35.6% del valor de *Bacteroides*, debido a que el iniciador Bacter se alinea en un 35.6% con secuencias de *Prevotella*. Sin embargo, en las muestras de *Bacteroides* con ausencia de *Prevotella*, no habría material que el iniciador Bacter identificara.

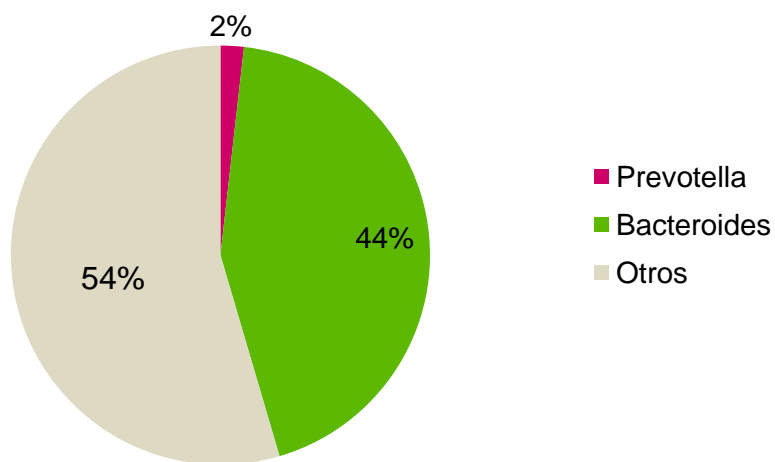
La cuantificación individual de *Prevotella* y *Bacteroides* en los miembros del grupo de DT1, EC y de control una vez corregidos usando los factores antes mencionados, se muestran a continuación.

En la Figura 7 se presenta la acumulación relativa de *Prevotella* y *Bacteroides* de los participantes con DT1. El caso D1 presentó 12% de *Prevotella* y 19% de *Bacteroides*. La acumulación de *Prevotella* fue prácticamente indetectable en los seis casos restantes. Respecto a *Bacteroides*, el caso D2 tuvo 59%, el caso D3 presentó un 85%. El porcentaje más bajo de *Bacteroides* fue de 19% en el caso D4. La mayor acumulación de *Prevotella* corresponde a un niño con una dieta un tanto más equilibrada en nutrimentos (Fig. 1) y un buen control de la enfermedad (Tabla 4).



**Figura 7. Cuantificación individual de *Prevotella* y *Bacteroides* en niños con DT1 con al menos 1 año de evolución**

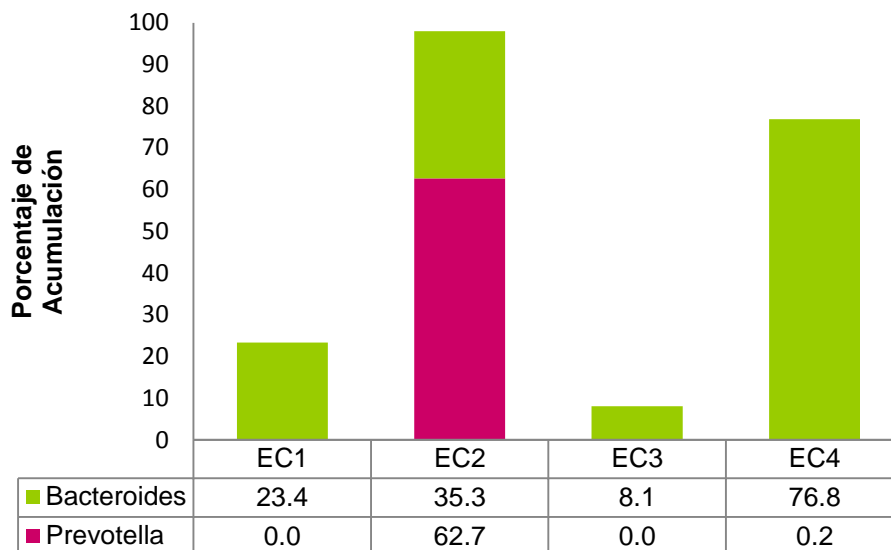
La acumulación promedio de *Prevotella* y *Bacteroides* de los pacientes con DT1 se encuentra en la Figura 8. En la cuantificación de *Prevotella* se calcula 2% de acumulación. En *Bacteroides* se estima que la cuantificación de este microorganismo es del 44%.



**Figura 8. Cuantificación promedio (corregida) de *Prevotella* y *Bacteroides* en niños con DT1 con al menos un año de evolución.**

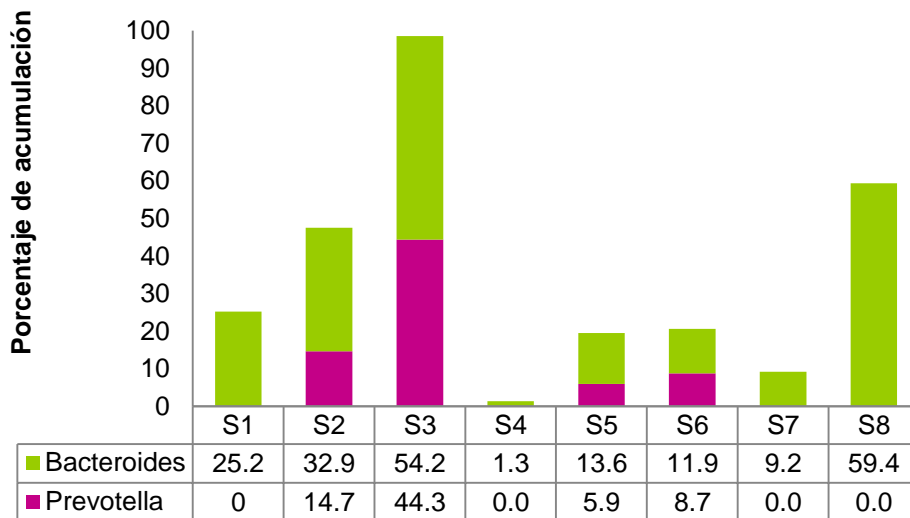
Los resultados de acumulación obtenidos en este trabajo se contrastaron con los de Mejía-León *et al.* (2014), también en niños y jóvenes sonorenses, entre 7 y 18 años de edad. Aunque en promedio sería del 2% la acumulación de *Prevotella* en los niños con DT1 de nuestro estudio, es obvio que no se puede trabajar con ese dato que procede de un solo caso. La comparación que sí es más válida de los niños con DT1 con al menos un año de evolución de esta tesis, es en acumulación de *Bacteroides* con prácticamente el mismo porcentaje de los niños recién diagnosticados en el estudio previamente citado (44%) (Mejía-León *et al.*, 2014). Posiblemente, los datos que nos proporcionaron de hemoglobina glicosilada en el registro de historial clínico, no sean lo suficientemente actuales como para considerar que solo tres casos no tienen la enfermedad controlada (Tabla 4).

En la Figura 9 se muestra la cuantificación individual de *Prevotella* y *Bacteroides* de los niños con EC. El valor más alto de *Prevotella* se registró en el caso EC2 con 62%, el resto tuvo valores cercanos a cero. El caso EC1 presentó 23% de *Bacteroides*, el caso EC2 un 35%. En el caso 3 se encontró el menor porcentaje de *Bacteroides* de todo el grupo, con 8%; por último, el caso EC4 registró 76%.



**Figura 9. Cuantificación individual de *Prevotella* y *Bacteroides* en niños con enfermedad celiaca con al menos un año de evolución**

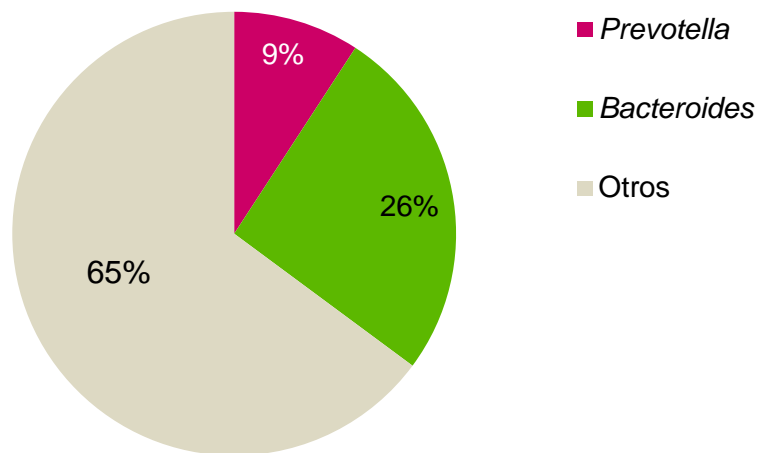
La acumulación de *Prevotella* y *Bacteroides* en cada uno de los niños sanos se ilustra en la Figura 10. No se detectó *Prevotella* en los casos S1, S4, S7 y S8, pero sí en el resto. En el caso S2 hubo 14%, el caso S3 alcanzó 44%, el caso S5 tuvo 5% y el caso S6 registró 8% de acumulación. En cuanto a *Bacteroides*, el caso S1 tuvo 25%, el caso S2 un 32%. El caso S3 presentó 54%, el porcentaje más bajo se encontró en el caso S4 con 1%. Los casos S5 y S6 tuvieron 13% y 11% de acumulación, respectivamente. El caso S7 registró 9% y por último, en el caso S8 se encontró el valor más alto con una acumulación del 59%.



**Figura 10. Cuantificación individual de *Prevotella* y *Bacteroides* en heces de niños sanos**

Los valores promedios en la cuantificación de *Prevotella* y *Bacteroides* en niños sanos se muestran en la Figura 11. *Prevotella* representó el 9% de la microbiota en general y *Bacteroides* el 26%.





**Figura 11. Cuantificación grupal de *Prevotella* y *Bacteroides* en heces de niños sanos**

Es notorio que hay más individuos con *Prevotella* en el grupo de los niños sanos (Figura 10) que en DT1 (Figura 8) o EC (Figura 9). La mitad de este grupo saludable, muestra entre 5% y 44% del total de la microbiota representado por *Prevotella* y valores que van del 1% al 59% de *Bacteroides*. Aunque la estimación de la acumulación de *Prevotella* de cada niño muestra diferencias con el estudio de Mejía-León *et al.* (2014), también en población sonoreense, el comportamiento en general se asemeja al obtenido en dicha investigación. En cuanto a *Bacteroides*, el promedio de estimación fue superior a lo encontrado en el trabajo antes mencionado. La presencia de casos atípicos - como los individuos S3 y S4- causa una desviación demasiado grande.

Ley *et al.* (2006), sostienen que los Bacteroidetes, como parte de la relación Firmicutes/Bacteroidetes, se consideran de relevancia significativa en la microbiota intestinal humana. Esta relación aumenta desde el nacimiento hasta la edad adulta y se altera con la edad más avanzada (Mariat *et al.*, 2009). El análisis realizado a la microbiota de los niños y jóvenes sonorenses en este trabajo de investigación nos permite ver que, en general, *Prevotella* y *Bacteroides*, pertenecientes al grupo Bacteroidetes tienen una presencia importante en la microbiota de los niños entre 8 y 16 años y coincide con lo presentado por Mejía-León *et al.* (2014). La presencia de Bacteroidetes también se ha observado y analizado en población infantil finlandesa y española, tanto en niños con DT1 y como en niños sanos (Murri *et al.*, 2013)

## Dieta y Microbiota Intestinal en DT1 y EC

Se han estudiado las diferencias en la microbiota de niños con DT1 o EC, en comparación con la de niños saludables (Murri *et al.*, 2013; Schippa *et al.*, 2010; Francavilla *et al.*, 2014). Así mismo, se conoce sobre los cambios en la dieta en niños con DT1 o EC después de ser diagnosticados (Patton *et al.*, 2013; Kurppa *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay estudios que muestren el efecto de los cambios dietarios a consecuencia de DT1 o EC, sobre la microbiota.

Debido a que se encontró mucha variabilidad en las características de los participantes, y el tamaño de muestra es muy reducido, no se pudo hacer un análisis estadístico, sino una descripción de casos. Para facilitar tal descripción, se construyeron tres tablas con el contenido de los nutrientes de interés y la acumulación de *Bacteroides* y *Prevotella*, en cada grupo estudiado.

En la Tabla 7, correspondiente a los niños con DT1, se presentan la contribución de los nutrientes de interés a su dieta, así como la acumulación de *Bacteroides* y *Prevotella*, en sus heces.

**Tabla 7. Nutrientes (como porcentajes de la energía total) y fibra (g/día) en la dieta de niños con DT1; y acumulación relativa de *Bacteroides* y *Prevotella* en heces**

Caso	Grasas totales (%)	Proteínas (%)	Grasas saturadas (%)	Carbohidratos (%)	Fibra dietética (g/día)	<i>Bacteroides</i> (%)	<i>Prevotella</i> (%)
D1	23.4	13.4	7.2	63.2	56.4	11.62	12.41
D2	32.3	9.0	11.1	58.7	4.1	41.20	0.00
D3	41.9	20.6	13.6	37.4	30.8	59.26	0.00
D4	19.3	17.3	6.7	63.4	54.9	13.30	0.002
D5	36.3	19.2	6.9	44.5	19.1	25.74	0.16
D6	47.0	23.1	14.0	29.8	13.9	23.50	0.00
D7	40.3	18.0	21.2	41.7	14.2	14.58	0.00

En el grupo de DT1, el caso D1 es un niño de 14 años al momento del muestreo, con 5 años de evolución en la enfermedad. Fue el único que presentó acumulación de *Prevotella*, también tuvo el consumo más alto de fibra con 56.4 g/día (Tabla 7). Esto concuerda con la asociación entre consumo de fibra y *Prevotella* descrita por David *et al.* (2014). Este mismo caso (D1) registró el nivel más bajo de *Bacteroides* (Tabla 7) y en su dieta se encontraban porcentajes de grasa total y proteína un poco por debajo de lo recomendado. Su puntaje Z IMC/Edad era de -1.45, y aunque un tanto bajo de peso, mantenía buen nivel de actividad física y buen control de la DT1.

El caso D2, niño de 14 años al tiempo del muestro, con 2 años de evolución de la DT1, su dieta era muy desequilibrada, con solo 4 g/día de fibra, baja ingestión de proteína y alta de grasas saturadas (Tabla 7). No se detectó *Prevotella* y la acumulación de *Bacteroides* fue del 41% de su microbiota. La madre comentó la apatía que mostraba al seguir un control de su dieta, lo cual está bien tipificado en adolescentes (Borus & Laffel, 2010; Svoren *et al.*, 2007; Silverstein *et al.*, 2005). Aunque su puntaje Z de IMC/Edad fue de 0.52 y lo ubica en normopeso, se mostraba con poca energía y a menudo prefería tomar siesta por la tarde que comer.

El caso D3 es una niña de 12 años al tiempo del muestro, con 2 años de evolución de la DT1. Se encontró que su dieta estaba muy mal equilibrada, con altos consumos de proteína y grasas, especialmente la grasa saturada y muy bajo consumo de carbohidratos, aunque en fibra cumplió con la recomendación para su edad y sexo (26 g/día). No presentó *Prevotella* y casi 60% de *Bacteroides*, la mayor acumulación del grupo de DT1, en su microbiota (Tabla 7). El padre de la niña dijo que, aunque a veces tiene más de 200 mg/dL de glucosa, no presentaba síntomas como debilidad o convulsiones. Aunque perdió peso al inicio de la DT1, actualmente su puntaje Z IMC/Edad es de 1.35.

El caso D4 es una niña de 13 años con más de 3 años de diagnóstico de DT1. Su dieta presentó el consumo más alto de carbohidratos y el segundo más alto en fibra; aunque esto no redundó, contrariamente a lo esperado, en un alto porcentaje de *Prevotella*; su acumulación fue cercana a cero (Tabla 7). Su ingestión de grasas totales y saturadas, fue muy baja, mientras que las proteínas superaron la recomendación. La acumulación de *Bacteroides* estaba en el segundo lugar más bajo del grupo (Tabla 7). Probablemente la proteína provenga de frijol, tortillas de maíz y arroz, alimentos recurrentes en su dieta. Su puntaje Z IMC/Edad fue de -1.25, tiene infecciones frecuentes y se deshidrata con facilidad.

El caso D5 es una joven de 15 años con casi 3 años de evolución de la DT1, además padece hipotiroidismo que controla con tratamiento. Ingiere menos carbohidratos y fibra de los recomendados, y su acumulación de *Prevotella* fue cercana a cero. La ingestión de grasas totales está algo alta, aunque de las saturadas está adecuada; la de proteínas fue mayor a la recomendación (Tabla 7). *Bacteroides* se encontró en el medio de los valores de este grupo con 24% de acumulación. El puntaje Z IMC/Edad fue normal (0.52). Debido a que vive en una localidad rural (dentro del municipio de Magdalena, Sonora) fuera de Hermosillo no le es fácil comprar alimentos integrales, por lo que suprime alimentos ricos en carbohidratos. Se encuentra en control de la enfermedad.

El caso D6 es un joven de 15 años con dos años de evolución de DT1. Tenía una dieta con gran restricción de carbohidratos y de fibra; las grasas totales, grasas saturadas y proteínas superan en mucho, las recomendaciones. No se detectó *Prevotella* y la acumulación de *Bacteroides* se ubicó en el medio de los valores del grupo (Tabla 7). El puntaje Z IMC/Edad fue de 1.24. La madre vigila estrictamente el régimen de alimentación, aunque el joven presenta resistencia a comer cereales integrales y lo hace en baja cantidad.

Finalmente, el caso D7, es una joven de 15 años diagnosticada con DT1 a los 13 años, además con hipotiroidismo bajo tratamiento. Antes de que la DT1 se manifestara la joven era atleta de alto rendimiento. Actualmente continúa ejercitándose, en menor grado. En el régimen los consumos de carbohidratos y fibra fueron bajos; el de grasas totales y proteínas fueron mayores que la recomendación y el de grasas saturadas la duplicaron (Tabla 7). No se encontró *Prevotella* y *Bacteroides* en su microbiota intestinal se estimó sólo en un 13%, difiriendo de lo esperado según investigaciones como la de Wu *et al.* (2011). Tuvo un puntaje Z IMC/Edad de 1.45 lo cual indica sobrepeso. En la entrevista su madre dijo que preparaba bebidas de frutas naturales y usaba productos integrales, pero la joven acostumbra comer comidas como pizza o tacos más de una vez por semana.

En el grupo DT1, sólo un caso (D1) parece tener un mejor control de la enfermedad y su microbiota se observó mejor equilibrada hacia el enterotipo *Prevotella*, probablemente debido al alto consumo de fibra. Sin embargo, a pesar de no manifestar episodios de hiperglicemia, fatiga u otros síntomas asociados a la diabetes, el puntaje Z IMC/Edad indica que el niño está en desnutrición. El consumo alto de fibra podría estar implicado en la desnutrición, ya que el resto de los nutrientes se encuentran cerca de las recomendaciones, sin embargo también deben considerarse las actividades físicas realizadas, la complejidad del paciente y otros hábitos.

Por otro lado el caso D4, al igual que el D1 tuvo un consumo notablemente alto de fibra y tiene desnutrición, pero a diferencia del primer caso, la participante tiene descompensaciones frecuentemente.

Los casos D2, D3 y D6 que consumieron más del 8% de grasas saturadas, además de otros desequilibrios de nutrientes, tuvieron estimaciones elevadas de *Bacteroides*. Mención aparte merecen los casos D5 y D7 quienes además padecen hipotiroidismo, pues podrían presentar sobrecrecimiento bacteriano en

el intestino (Almandoz *et al.*, 2012; Ebert, 2010), lo cual modificaría su microbiota.

En resumen, y con toda la cautela de la gran variabilidad intergrupala observada, los niños con DT1 de este estudio, modificaron su dieta restringiendo carbohidratos y aumentando grasas, especialmente las saturadas. Esto dio como resultado una composición de la microbiota en la cual *Bacteroides* tiene una acumulación relativa mayor que *Prevotella*.

En la Tabla 8, correspondiente a los niños con EC, se presenta la contribución de los nutrientes de interés a su dieta, así como la acumulación de *Bacteroides* y *Prevotella*, en sus heces.

**Tabla 8. Nutrientes (como porcentajes de la energía total) y fibra (g/día) en la dieta de niños con EC; y acumulación relativa de *Bacteroides* y *Prevotella* en heces**

Caso	Grasas totales (%)	Proteínas (%)	Grasas saturadas (%)	Carbohidratos (%)	Fibra dietética (g/día)	<i>Bacteroides</i> (%)	<i>Prevotella</i> (%)
EC1	22.09	12.5	9.6	65.4	30.9	23.4	0.003
EC2	21.9	19.9	8.9	58.2	34.5	35.3	62.69
EC3	48.6	14.8	12.1	36.7	12.7	8.1	0.003
EC4	26.1	17.8	9.1	56.1	31.4	76.8	0.15

El caso EC1 del grupo de EC, es un niño de 9 años, diagnosticado a los 2 años de edad. En su dieta se observó alto consumo de carbohidratos y una ingestión adecuada de fibra dietética; su ingestión de grasas totales y proteína fue un tanto baja respecto a la recomendación. La estimación de *Prevotella* fue cero y *Bacteroides* se estimó en un 23% en su microbiota (Tabla 8). El niño tuvo un puntaje Z IMC/Edad de -1.54, se encontró que tiene una talla baja para su edad.

El niño del caso EC1, presentó irritabilidad y estrés, debido quizá a la desnutrición, al mal control de su enfermedad y a las constantes visitas al

médico. La madre dijo que es difícil hacerlo seguir la dieta estrictamente, manifestó apetencia temporal por ciertos alimentos. En vista del apetito errático del niño, su madre prefiere dejarlo comer lo que él quiera en vez de mantenerlo restringido.

El caso EC2 corresponde a un niño de 11 años con EC desde los 8 años. Los carbohidratos estaban en exceso a lo recomendado y tuvo alto consumo de fibra dietética (35 g/día); quizá por eso es el único caso donde se cuantificó *Prevotella* en un porcentaje muy alto (64%). Grasas totales y saturadas se adecuaron a la recomendación, mientras que el porcentaje de proteína fue demasiado alto. La estimación de *Bacteroides* para este caso fue de 35% (Tabla 8). El niño tuvo un puntaje Z IMC/Edad de 1.23. Llevaba una dieta sin gluten, con exceso de energía de carbohidratos y proteína, que lo ubican en sobrepeso. Dos meses antes de este estudio, fue sometido a cirugía a causa de una esofagitis, lo que podría haber afectado a la microbiota, induciendo el sobrecrecimiento de Bacteroidetes encontrado en este estudio.

El caso EC3 es un niño de 3 años de edad, diagnosticado con EC a los meses de nacido. Registró una ingestión baja de carbohidratos y la fibra no alcanzó la recomendación de 19 g/día, acorde a su edad; la estimación de *Prevotella* en su microbiota fue cercana a cero (Tabla 8). La ingestión de grasas totales y grasas saturadas fue muy alta, mientras que la ingestión de proteínas fue adecuada (Tabla 8). En este caso se encontró la acumulación más baja de *Bacteroides*, con solo 8%. El niño presentó un puntaje Z IMC/Edad de 1.2 con sobrepeso. De acuerdo con su historial, ha tenido mejorías graduales desde el diagnóstico y muestra apertura a nuevos alimentos.

El caso EC4 es una niña de 4 años de edad con 2 años de diagnóstico de EC. En su dieta el porcentaje de carbohidratos estaba ligeramente alto, aunque con alto contenido de fibra que superan los 25 g/día recomendados para su edad; su ingestión de grasas totales es casi adecuada, aunque las saturadas estaban

en exceso (Tabla 8). Su acumulación de *Prevotella* fue cercana a cero y *Bacteroides* estaba en muy alta proporción (76%). Su puntaje Z IMC/Edad es de 0.61 indica que tiene un peso normal; ha tenido una evolución positiva después del diagnóstico y la dieta sin gluten. Según la madre, aunque la niña tiene una dieta variada, come pocas frutas.

Es difícil hacer un resumen conjunto de 4 casos tan disímiles de EC; difieren en edades, sexo e ingestión de nutrientes, aunque todos con dieta desequilibrada. El único niño que parece tener buen control de la enfermedad es el del caso EC2, que como otros con enfermedad celiaca, tienden a exceder el peso corporal por la dieta sin gluten. No se puede inferir sobre la asociación entre enterotipos y nutrientes, ya que en un caso parecen asociarse carbohidratos y fibra con *Prevotella* y en otro proteínas y grasas saturadas con *Bacteroides* y en los dos restantes no hay tal asociación. En los celíacos sería positivo encontrar *Prevotella* ya que refuerza la integridad de la barrera intestinal produciendo mucina y péptidos antimicrobianos (Pryde *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2011).

En la Tabla 9, correspondiente a los niños saludables, se presenta la contribución de los nutrientes de interés a su dieta, así como la acumulación de *Bacteroides* y *Prevotella*, en sus heces.

**Tabla 9. Nutrientes (como porcentajes de la energía total) y fibra (g/día) en la dieta de niños saludables; y acumulación relativa de *Bacteroides* y *Prevotella* en heces**

Caso	Grasas totales (%)	Proteínas (%)	Grasas saturadas (%)	Carbohidratos (%)	Fibra dietética (g/día)	<i>Bacteroides</i> (%)	<i>Prevotella</i> (%)
S1	45.58	15.5	19.8	38.9	22.2	25.2	00
S2	26.86	9.8	9.6	63.3	14.4	32.9	14.7
S3	23.89	23.1	10.4	54.0	31.1	54.2	44.3
S4	17.09	12.9	6.8	70.1	19.5	1.3	00
S5	23.22	18.3	9.1	58.5	32.0	13.6	5.9
S6	32.22	13.4	8.6	54.4	21.3	11.9	8.7
S7	31.42	11.14	9.9	57.4	16.1	9.2	00
S8	20.4	31.0	12.1	49.4	29.0	59.4	00



Como se pudo observar antes en los 3 grupos de estudio, en los niños sanos aparece más frecuentemente *Prevotella* y las acumulaciones de *Bacteroides* no son tan elevadas como en los niños con DT1 o con EC. Con sus reservas, las dietas de los niños sanos, están mejor equilibradas que las de los niños con DT1 o EC. Aun así, es difícil asociar la composición de la dieta a los enterotipos en estudio; sin embargo, parece que la baja o nula acumulación del enterotipo, se relaciona con baja ingestión de un nutriente. Así, dos de los cuatro casos sin *Prevotella* tienen una baja ingestión de carbohidratos y uno más de fibra. Tres de los casos con baja ingestión de proteínas, se asocian a tres de los cuatro casos con baja acumulación de *Bacteroides*.

Para tener un mejor panorama, se explican brevemente las generalidades de los casos de niños saludables. El caso S1 es un niño de 11 años con el consumo más bajo de carbohidratos de todo este grupo y también bajo consumo de fibra, fue uno de los casos sin *Prevotella*. Su energía la obtiene de un exceso de grasas totales (45.5%) y saturadas (19.8%). La acumulación de *Bacteroides* fue del 25%. Es un niño obeso con puntaje Z IMC/Edad de 2.5.

El caso S2 corresponde a una niña de 10 años con ingestión un tanto alta de carbohidratos (63%) y menos de los 26 g/día de fibra recomendados; la estimación de *Prevotella* alcanzó un 14%. Tuvo un consumo bajo de proteínas, adecuado de grasas totales y alto en grasas saturadas, la estimación de *Bacteroides* fue de 32%. Es una niña obesa con puntaje Z IMC/Edad de 2.4.

El caso S3 es una niña de 13 años con consumo de carbohidratos y fibra adecuado y la estimación más alta de *Prevotella* (44%) de su grupo. La ingestión de grasas totales está ligeramente por debajo de la recomendación, mientras que proteínas y grasas saturadas están altas. Su acumulación de *Bacteroides* se estimó en 54%, dentro de las más altas del grupo. Es una niña con normopeso y con talla adecuada para su edad.

El caso S4 corresponde a una niña de 9 años, con un consumo excesivo de carbohidratos (73%), baja ingestión de fibra y cuya estimación de *Prevotella* fue cercana a cero. Por otro lado, las grasas totales, grasas saturadas y proteínas estuvieron por debajo de las recomendaciones. Presentó la estimación más baja de *Bacteroides*, con sólo 1%. Su puntaje Z IMC/Edad fue de 1.96 lo cual indica sobrepeso, tendiendo a obesidad.

El caso S5 es una joven de 16 años, cuya ingestión de carbohidratos, al igual que de fibra superan ligeramente la recomendación; se estimó *Prevotella* en 5%. Las grasas totales están por debajo de la recomendación, mientras que las grasas saturadas y las proteínas la superan; la estimación de *Bacteroides* fue de 13%. El puntaje z IMC/Edad de 0.73 la ubica en peso normal.

El caso S6 es una niña de 14 años cuyo consumo de carbohidratos estuvo dentro de las recomendaciones, no así en fibra que no alcanzó la recomendación; la estimación de *Prevotella* fue de 8.7%. Las grasas totales estuvieron dentro del porcentaje recomendado, las proteínas por debajo de éste y las grasas totales lo superaron ligeramente; *Bacteroides* se estimó en 13%. El puntaje Z IMC/Edad de 0.57 indica normopeso en la niña.

El caso S7 es una niña de 12 años, con consumo de carbohidratos ligeramente mayor que la recomendación, mientras que el de fibra fue bajo; y presentó *Prevotella* en su microbiota. La ingestión de grasas totales fue adecuada, la de proteínas quedó baja y las grasas totales superaron la recomendación; la acumulación de *Bacteroides* se estimó en 9%. El puntaje Z IMC/Edad de 1.24 indica que la niña tiene sobrepeso.

El caso S8 es un joven de 16 años, con baja ingestión de carbohidratos y fibra; sin presencia de *Prevotella* en su microbiota. Su ingestión de grasas totales fue bajo, pero alto el de grasas saturadas y proteínas, el más alto del grupo (30%). Asociado a estos últimos, el porcentaje de *Bacteroides* fue también el más alto, con 59%. El joven presentó desnutrición, con puntaje Z IMC/Edad de -2.05.

## CONCLUSIONES

En general se advirtió una inclinación por los alimentos altos en grasas y proteínas en los participantes. Como ya se detalló en la sección “Composición de la dieta”, en el grupo de DT1 el consumo promedio de grasas totales y grasas saturadas fue mayor que en el grupo control, mientras que el consumo de carbohidratos fue mucho menor. Aunado a esto, la estimación promedio de *Bacteroides* también fue más alta y la de *Prevotella* menos frecuente, en los niños con DT1 que en los niños saludables.

Esta tesis se generó sobre el cuestionamiento de si son los cambios dietarios los causantes de que la microbiota no recupere su equilibrio en los niños con DT1 o EC. Con todas las limitaciones de la variabilidad en la muestra y el problema en la cuantificación de *Prevotella*, los resultados sugieren que la alimentación afectó la microbiota, especialmente en los casos con DT1. Sin embargo, no se pudo comprobar estadísticamente tal aseveración, debido a que la mayoría de los niños con DT1 o EC, no tenían la enfermedad controlada.

## BIBLIOGRAFÍA

Abarzúa J, Alvarado C, Aravena A. Diabetes mellitus type 1: Genetic aspects. *Medwave* 2005;5:3365.

Abbas A, Lichtman AH. *Inmunología celular y molecular*. 6ta ed. Madrid, España: Elsevier Saunders, 2008.

Aguirre MA, Rojas J, Cano R, Villalobos M, Paoli M, Berrueta L. Diabetes mellitus tipo 1 y factores ambientales: La gran emboscada. *Rev Venez Endocrinol Metab* 2012;10:122-134.

Almandoz JP, Gharib H. Hypothyroidism: Etiology, diagnosis, and management. *Med Clin North Am* 2012;96:203-221.

ADA. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2014. *Diabetes Care* 2014;1:S14-S80.

Arranz E, Montalvillo E, Garrote JA. Inmunopatogenia de la enfermedad celiaca. En: Rodrigo L y Peña AS, eds. *Enfermedad celiaca y sensibilidad al gluten no celiaca*. Barcelona, España: OmniaScience, 2012:123-149.

Artis D. Epithelial cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008;8:411-420.

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR *et al*. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-180.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Eng J Med* 2002;347:911-920.

Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1729-1738.

Bekele AZ, Koike S, Kobayashi Y. Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 305:49-57.

Berg AM, Kelly CP, Farraye FAI. *Clostridium difficile* infection in the inflammatory bowel disease patient. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:194-204.

Borus JS, Laffel L. Adherence challenges in the management of type 1 diabetes in adolescents: Prevention and intervention. *Curr Opin Pediatr* 2010;22:405-411.

Bozzola CM. Principios de la tolerancia oral. *Arch Alergia Inmunol Clin* 2003;34;1:2-5.

Bourges H, Casanueva E, Rosado JL. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. Tomo 2. México: Instituto Danone y Editorial Médica Panamericana, 2008.

Brook I. Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol* 1999;25:155-172.

Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N *et al.* Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS ONE* 2011;6: e25792.

Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients* 2012;48:1095-1119.

Cabrera Rodé E. Asociaciones entre la celiacía y la diabetes mellitus. La experiencia cubana. *Rev Cub Aliment Nutr* 2010;20:S54-S62.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57:1470-1481.

Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, Burcelin R. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 2006;55:1484-1490.

Canova C, Zabeo V, Pitter G, Romor P, Baldovin T, Zanotti R, Simonato L. Association of maternal education, early infections, and antibiotic use with celiac disease: A population-based birth cohort study in northeastern Italy. *Am J Epidemiol* 2014;180:76-85.

Cavallo MG, Fava SD, Monetini L, Barone F, Pozzilli P. Cell-mediated immune response to  $\beta$ -casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: Implications for disease pathogenesis. *Lancet* 1996;348:926-928.

Chiang JL, Kirkman MS, Laffel LM, Peters AL. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2014;37:2034-2054.

Chorny A, Puga I, Cerutti A. Innate signaling networks in mucosal IgA class switching. *Adv Immunol* 2010;107:31-69.

Chow J, Tang H, Mazmanian SK. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol* 2011;23:473–480.

Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol* 2009;62:264–269.

Colman PG, McNair PD, Gellert S, Kewming K, Schmidli RS, Steele CE *et al.* Development of autoantibodies to islet antigens during childhood: implications for preclinical type 1 diabetes screening. *Pediatr Diabetes* 2002;3:144-148.

Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:435–446.

Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 2007;137:781S-790S.

Dabelea D. The accelerating epidemic of childhood diabetes. *Lancet* 2009; 373:1999-2000.

David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE *et al.* Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014 23;505:559-563.

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14691–14696.

Diamanti A, Capriati T, Basso MS, Panetta F, Di Ciommo Laurora VM, Bellucci F *et al.* Celiac disease and overweight in children: An update. *Nutrients* 2014;6:207-220.

DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc* 2008;83:460-9.

Dwivedy A, Aich P. Importance of innate mucosal immunity and the promises it holds. *Int J Gen Med* 2011;4:299.

Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 2008;226:160–171.

Ebert EC. The thyroid and the gut. *J Clin Gastroenterol* 2010;44:402–406.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635–1638.

Eizirik DL, Darville MI. Beta-cell apoptosis and defense mechanisms: Lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* 2001;50:S64-69.

Errichiello S, Esposito O, Di Mase R, Camarca ME, Natale C, Limongelli MG *et al.* Celiac disease: Predictors of compliance with a gluten-free diet in adolescents and young adults. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:54-60.

Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R *et al.* Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: Geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:77–84.

Faulkner MS, Chao WH, Kamath SK, Quinn L, Fritschi C, Maggiore JA *et al.* Total homocysteine, diet, and lipid profiles in type 1 and type 2 diabetic and nondiabetic adolescents. *J Cardiovasc Nurs* 2006;21:47–55.

Forsberg G, Hernell O, Melgar S, Israelsson A. Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterol* 2002;123:667-678.

Fouhy F, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C, Cotter PD. Composition of the early intestinal microbiota knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes* 2012;3:203-220.

Fourlanos S, Harrison LC, Colman PG. The accelerator hypothesis and increasing incidence of type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:321-325.

FrancaVilla R, Ercolini D, Piccolo M, Vannini L, Siragusa S, De Filippis F *et al.* Salivary microbiota and metabolome associated with celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:3416-3425.

Garavito G, Del Toro K, Egea E, Egea EE, Navarro E. Inmunogenética e inmunopatología de la diabetes insulín dependiente tipo I. *Salud Uninorte* 2005;20:45-58.

Gellar Lauren A, Schrader Kelly, Nansel Tonja R. Healthy eating practices: Perceptions, facilitators, and barriers among youth with diabetes. *Diabetes Educator* 2007;33:671-679.

Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312:1355-1359.

Gillespie KM, Aitken RJ, Wilson I, Williams AJK, Bingley PJ. Early onset of diabetes in the proband is the major determinant of risk in HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 siblings. *Diabetes* 2014; 63:1041–1047.

Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R *et al.* Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014;159:789–799.

Grant WB. Ultraviolet-B irradiance and vitamin D reduce the risk of viral infections and thus their sequelae including autoimmune diseases and some cancers. *Photochem Photobiol* 2008; 84:356-365.

Grönlund MM, Nuutila J, Pelto L, Lilius EM, Isolauri E, Salminen S *et al.* Mode of delivery directs the phagocyte functions of infants for the first 6 months of life. *Clin Exp Immunol* 1999;116:521-526.

Guarner F. Microbiota intestinal *Nutr Hosp* 2007;22:14-19.

Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K: Development of a realtime PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol* 2008;47:367-373.

Hansen CHF, Krych L, Nielsen DS, Vogensen FK, Hansen LH, Sørensen SJ *et al.* Early life treatment with vancomycin propagates *Akkermansia muciniphila* and reduces diabetes incidence in the NOD mouse. *Diabetologia* 2012;55:2285–2294.

Helgeland L, Dissen E, Dai KZ, Midtvedt T, Brandtzaeg P, Vaage JT. Microbial colonization induces oligoclonal expansions of intraepithelial CD8 T cells in the gut. *Eur J Immunol* 2004;34:3389-3400.

Helgeson VS, Viccaro L, Becker D, Escobar O, Siminerio L. Diet of adolescents with and without diabetes: Trading candy for potato chips? *Diabetes Care* 2006;29:982–987.

Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012;336:1268–1273.

Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R *et al.* European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:136-160.

Institute of Medicine (U.S.) Panel on Macronutrients; Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. *Dietary Reference Intakes For Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids.* The National Academies Press:Washington, 2005.



ISAK, International Society for the Advancement of Kinanthropometry  
International standards for anthropometric assessment. ISAK: Australia, 2001

Ivarsson A, Myléus A, Norström F, Van der Pals M, Rosén A, Högberg L *et al.*  
Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. *Pediatrics*  
2013;131:e687.

Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Longterm ecological impacts of  
antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME J* 2007;1:56–  
66.

Jiang XH, Li N, Li JS. Intestinal permeability in patients after surgical trauma and  
effect of enteral nutrition versus parenteral nutrition. *Age* 2003;50:53-61.

Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J*  
*Clin Inv* 2007;117:41-49.

Kautto E, Ivarsson A, Norström F, Högberg L, Carlsson A, Hörnell A. Nutrient  
intake in adolescent girls and boys diagnosed with coeliac disease at an early  
age is mostly comparable to their non-coeliac contemporaries. *J Hum Nutr Diet*  
2014;27:41–53.

Keeney KM, Yurist-Doutsch S, Arrieta MC, Finlay BB. Effects of antibiotics on  
human microbiota and subsequent disease. *Annu Rev Microbiol* 2014;68:217-  
235.

Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Åkerblom HK.  
Environmental triggers and determinants of  $\beta$ -cell autoimmunity and type 1  
diabetes. *Diabetes* 2005;54:125–136.

Kurppa K, Lauronen O, Collin P, Ukkola A, Laurila K, Huhtala H *et al.* Factors  
associated with dietary adherence in celiac disease: A nationwide study.  
*Digestion* 2012;86:309–314.

Lee AS, Gibson DL, Zhang Y, Sham HP, Vallance BA, Dutz JP. Gut barrier  
disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice.  
*Diabetologia* 2010;53:741–748.

Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution  
of the adaptive immune system? *Science* 2010;330:1768-1773.

León AJ, Garrote JA, Blanco-Quirós A, Calvo C, Fernández-Salazar L, Del Villar  
A *et al.* Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease  
patients. *Clin Exp Immunol* 2006;146:479–485.

Ley RE, Turnbaugh P, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut  
microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444:1022-1023.

Litherland SA. Immunopathogenic interaction of environmental triggers and genetic susceptibility in diabetes: Is epigenetics the missing link? *Diabetes* 2008;57:3184-3186.

Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH *et al.* The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 2013;62:43-52.

Ma RCW, Chan JC. Incidence of childhood type 1 diabetes: A worrying trend. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:529-530.

Maizels RM, McSorley HJ, Smyth DJ. Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? *Clin Exp Immunol* 2014;177:38–46.

Manrique C, Silva DG. Apoptosis de las células beta del páncreas. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 2006;54:3.

Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009;9:123.

Mayer L, Eisendhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1991;100:3-12.

Mayer-Davis EJ, Nichols M, Liese AD, Bell RA, Dabelea DM, Johansen JM *et al.* Dietary intake among youth with diabetes: The SEARCH for diabetes in youth study. *J Am Diet Assoc* 2006;106:689–697.

Mejía-León ME, Petrosino JF, Ajami NJ, Domínguez-Bello MG, Calderón de la Barca AM. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci Rep* 2014;4:3814.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003;3:331-341.

Mozes S, Bujnáková D, Sefčíková Z, Kmet V. Developmental changes of gut microflora and enzyme activity in rat pups exposed to fat-rich diet. *Obesity* 2008;16:2610-2615.

Murphy K, Travers P, Walport M, Ehrenstein M, Rivera Muñoz B, Palacios-Martínez R. *Inmunobiología de Janeway*. México: McGraw-Hill Interamericana, 2009.

Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F *et al.* Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: A case-control study. *BMC Med* 2013;11:46.

Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 2001;108:1247–1252.

O'Brecht L, Streisand R, Holmes CS, Mackey ER. Nutrition intake in early adolescents with type 1 diabetes. *PES 2013 Abstract* 1522.291.

O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports* 2006;7:688-693.

Olerup O, Aldener A, Fogdell A. LA-DQB1 and –DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993;41:119-134.

Orban T, Sosenko JM, Cuthbertson D, Krischer JP, Skyler JS, Jackson *et al.* Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the diabetes prevention trial–type. *Diabetes Care* 2009;32:2269–2274.

Ortega MI, Morales GG, Quizán PT, Preciado M. Cálculo de ingestión dietaria y coeficientes de adecuación a partir de registro de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos. Estimación de consumo de alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. 1999.

Palacios-Esquer MR, Tortoledo O, Torres E. Efecto de los hábitos alimentarios y comportamiento dietario en estudiantes adolescentes. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2011;49:29-35.

Palomo I, Ferreira A, Roseblatt M, Sepúlveda C y Vergara U. Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica. 2009. Disponible en: <http://editorial.usalca.cl/docs/ebook/inmunologia.pdf> (consultado en mayo 2013).

Parada A, Araya M, Pérez-Bravo F, Méndez M, Mimbacas A, Motta P *et al.* Amerindian mtDNA haplogroups and celiac disease risk HLA haplotypes in mixed-blood Latin American patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:429-434.

Parker W. The “hygiene hypothesis” for allergic disease is a misnomer. *BMJ* 2014;349:5267.

Patton SR, Dolan LM, Chen M, Powers SW. Dietary adherence and mealtime behaviors in young children with type 1 diabetes on intensive insulin therapy. *J Acad Nutr Diet* 2013;113:258-262.

Pokusaeva K, Fitzgerald, GF, van Sinderen, D. Carbohydrate metabolism in bifidobacteria. *Genes Nutr* 2011;6:285–306.

Porras M, Martín MT, Yang PC, Jury J, Perdue MH, Vergara P. Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:843–852.

Prieto M, Krochikc AG, Chaler E, Maceiras M, Villalba A, Valdez S *et al.* Obesidad y factores de riesgo del síndrome metabólico en jóvenes con diabetes tipo 1. *Medicina* 2012;72:291-297.

Prieto-Tenreiro A, Villar-Taibo R, Pazos-Couselo M, González-Rodríguez M, Casanueva F, García-López JM. Benefits of subcutaneous continuous insulin infusion in type 1 diabetic patients with high glycemic variability. *Endocrinol Nutr* 2012;59:246-253.

Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002;217:133-139.

Qi Z, Hamza I, O'Brian MR. Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:13056-13061.

Randecker GA, Smiciklas-Wright H, McKenzie JM, Shannon BM, Mitchell DC, Becker DJ *et al.* The dietary intake of children with IDDM. *Diabetes Care* 1996;19:1370-1374.

Reilly NR, Aguilar K, Hassid BG, Cheng J, Defelice AR, Kazlow P *et al.* Celiac disease in children with normal weight and overweight: clinical features and growth outcomes following a gluten-free diet. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:528–531.

Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* 2009;119:2441-2450.

Rewers M, Liu E, Simmons J, Redondo MJ, Hoffenberg EJ. Celiac disease associated with type 1 diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004;33:197-214.

Ruiz-Dyck KM. Polimorfismos de un solo nucleótido para identificar haplotipos de predisposición a enfermedad celiaca en niños sonorenses. Tesis de Maestría. Sonora: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo. 2012.

Sandoval SA, Camarena DM. Comportamiento alimentario y perfil de consumo de los sonorenses: El caso de las comidas internacionales. *Región y Sociedad* 2011;23:185-213.

Santacruz A, Marcos, A, Warnberg J, Marti A, Martin-Matillas M, Campoy C *et al.* Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* 2009;17:1906–1915.

Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F *et al.* Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006;55:1443-1449.

Schipa S, Iebba V, Barbato M, Di Nardo G, Totino V, Checchi MP *et al.* A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients. *BMC Microbiol* 2010;10:175.

Schuppan D, Junker I, Barisani D. Celiac Disease: From pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterol* 2009;137:1912-1933.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:859–904.

Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: A dynamic duo. *Annu Rev Physiol* 2011;73:283-309.

Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, Plotnick L, Kaufman F, Laffel L *et al.* Care of children and adolescents with type 1 diabetes: A statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005;28:186-212.

Snell-Bergeon JK, Chartier-Logan C, Maahs DM, Ogden LG, Hokanson JE, Kinney GL *et al.* Adults with type 1 diabetes eat a high-fat atherogenic diet that is associated with coronary artery calcium. *Diabetologia* 2009;52:801–809.

Soriano G, Guarner F. Prevención de la translocación bacteriana mediante probióticos y prebióticos. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26:23-30.

Sotelo Cruz N, Calderón de la Barca AM, Hurtado Valenzuela JG. Enfermedad celiaca en niños del noroeste de México: Características clínicas de 24 casos. *Rev Gastroenterol Mex* 2013;78:211-218.

Steinman L. A rush to judgment on Th17. *J Exp Med* 2008;05:1517–1522.

Stepniak D, Vader LW, Kooy Y, Van Veelen PA, Moustakas A, Papandreou *et al.* T-cell recognition of HLA-DQ2-bound gluten peptides can be influenced by an N-terminal proline at p-1. *Immunogenetics* 2005;57:8-15.

Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989;299:1259-1260.

Svoren BM, Volkening LK, Butler DA, Moreland EC, Anderson BJ, Laffel LM. Temporal trends in the treatment of pediatric type 1 diabetes and impact on acute outcomes. *J Pediatr* 2007;150:279-285.

Swillens S, Goffard JC, Maréchal Y, de Kerchove d'Exaerde A, El Housni H. Instant evaluation of the absolute initial number of cDNA copies from a single real-time PCR curve. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e56.

Szczawinska-Poplonyk A. An overlapping syndrome of allergy and immune deficiency in children. *J Allergy* 2012;2012:658279.

Tannock GW, What immunologists should know about bacterial communities of the human bowel. *Semin Immunol* 2007;19:94-105.

Tangye SG. Plasmacytoid DCs induce gut plasma cells. *Immunity* 2011;34:144-146.

The Ribosomal Database Project (RDP). 2000. Disponible en: <https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp> (consultada en octubre 20, 2014).

Tran TH, Smith C, Mangione RA. Drug absorption in celiac disease. *Am J Health Syst Pharm* 2013;70:2199-2206.

Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009;1:614.

Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability and mucosal immunity. *Diabetes* 2008 57:2555-2556.

Vaarala O. Human intestinal microbiota and type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2013;13:601-607.

Vaarala O. Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunol Cell Biol* 2012;90:271-276.

Valencia ME, Hoyos LC, Ballesteros MN, Ortega MI, Palacios MR, Atondo JL. La dieta en Sonora: Canasta de consumo de alimentos. *Estudios Sociales: Nutrición y Salud* 1998; 8:11-39.

Van den Bogert B, de Vos WM, Zoetendal EG, Kleerebezem M. Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:2071-2080.

Van Wijk F, Cheroutre H. Intestinal T cells: Facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. *Sem Immunol* 2009;21:130–138.

Vitoria JC, Bilbao JR. Novedades en enfermedad celiaca. *An Pediatr* 2013;78:1-5.

Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X *et al.* Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 2011;5:220–230.

Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17040-17045.

Wheeler ML, Dunbar SA, Jaacks LM, Karmally W, Mayer-Davis EJ, Wylie-Rosett *et al.* Macronutrients, food groups, and eating patterns in the management of diabetes a systematic review of the literature, 2010. *Diabetes Care* 2012;35:434-445.

Whiteside TL. Isolation of human NK cells and generation of LAK activity. *Curr Protoc Immunol* 1997;7:7.

Whiteside TL. Measurement of cytotoxic activity of NK/LAK cells. *Curr Protoc Immunol* 2001;7:7-18.

WHO (World Health Organization). Anthro for personal computers, version 3.2.2. Software for assessing growth and development of the world's children. 2010. Disponible en <http://www.who.int/childgrowth/software/en/> (consultada en septiembre 2013).

WHO (World Health Organization). AnthroPlus for personal computers Manual: Software for assessing growth of the world's children and adolescents. 2009. Disponible en <http://www.who.int/growthref/tools/en/> (consultada en septiembre 2013).

WHO (World Health Organization). Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 854. World Health Organization:Geneva. 1995.

Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: Revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001;1:69-75.

Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA *et al.* Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334:105–108.

Yamanaka T, Helgeland L, Farstad IN, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J Immunol* 2003;170:816-822.

Yang J, Martínez I, Walter J, Keshavarzian A, Rose DJ. *In vitro* characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe* 2013;23:74-81.

Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W *et al.* Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 2010;4:232–241.

Zimmer J, Lange B, Frick JS, Sauer H, Zimmermann K, Schwiertz A *et al.* A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *Eur J Clin Nutr* 2012;66:53–60.