



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

**DIETA, MICROBIOTA Y PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS
GRASOS DE CADENA CORTA EN NIÑOS
SONORENSES CON ENFERMEDAD CELIACA**

Por:

Rodrigo Sigala Robles

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de:

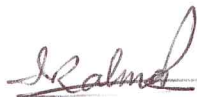
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Rodrigo Sigala Robles, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Ana María Calderón de la Barca
Directora de Tesis



Dra. Alma Rosa Islas Rubio
Asesora



Dra. Verónica Mata Haro
Asesora



Dra. Gloria Yepiz Plascencia
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

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo y facilidades brindadas para la culminación de este trabajo.

A el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD A.C.) por abrirme sus puertas y permitirme trabajar en sus instalaciones.

A cada uno de los participantes del estudio; sin ellos no hubiese sido posible el este trabajo.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para que esta tesis de Maestría pudiera culminarse durante este periodo de aprendizaje continuo. Muchas son las personas que han contribuido con su esfuerzo y paciencia. A todas ellas mi agradecimiento.

En primer lugar, a la *Dra. Ana María Calderón de la Barca*, directora de esta tesis, gracias por darme la oportunidad de ingresar al programa de Maestría en Ciencias en su laboratorio. Me llevo de usted su capacidad de análisis, consejos e ideas para poder mejorar siempre un trabajo de cualquier índole. También, recordaré que: "las cosas no son para mañana, sino para dos días antes de haberlas solicitado". Además, no olvidaré el café recién molido que traía y disfrutábamos en el laboratorio. Por otra parte, fueron buenos los partidos y charlas de futbol. Por todo y demás, muchas gracias.

En segundo lugar, a mis asesoras de tesis las Dras. Vero Mata, Gloria Yepiz Placencia y Alma Rosa Islas, que ayudaron con sus consejos en la elaboración de esta tesis, cada una desde su punto de vista. Sin su ayuda, no hubiera sido

esto posible. Quisiera agregar que las cátedras en sus diferentes áreas de conocimiento, fueron para mí muy motivantes y de mucho aprendizaje (me hubiera encantado estar al ciento por ciento). Muchas gracias.

En un lugar especial, a la Dra. Luz Vázquez, a quien agradezco su ayuda, su apoyo con equipo, personal y comentarios para el análisis de los ácidos grasos de la tesis. Haydee y Cuquis, muchas gracias; me llevo muchas enseñanzas de la estancia de análisis cromatográfico a su lado.

A mis compañeros de laboratorio que sin su ayuda en momentos difíciles esta tesis muy probablemente se hubiera quedado en planeación. Quiero agradecer a JP por enseñarme su paciencia al momento de trabajar. A René por ser paciente al enseñar cada una de las técnicas del laboratorio. También a Adriana, muchas gracias por cada una de las sonrisas, chocolates y frutas que compartiste conmigo. A mis compañeros Orlando, Andrea, Teté, Javier, Vero, Reyna, Nina y todos aquellos que pasaron por el laboratorio; gracias por su apoyo incondicional durante la realización de esta tesis y sus tan apreciadas sonrisas.

En especial, te agradezco a ti Sandra V. Aguayo Patrón, por levantarme del suelo y enseñarme que todo saldrá bien al final. Por esos días de café en Blvd. Progreso, durante los cuales platicábamos sin cesar y pensábamos en ideas para la mejora de este trabajo, sin tu ayuda no se hubiera realizado. También me ayudaste mucho en trabajo de laboratorio y las innumerables consultas. Muchas gracias por ese apoyo incondicional; te estaré eternamente agradecido.

Esta tesis también es vuestra.

DEDICATORIA

A Dios, que me ha brindado salud y bienestar para poder culminar con los estudios del posgrado.

A mi padre y mi madre, a los que no sé ni cómo describir su apoyo, porque me he quedado sin palabras. Ellos saben a qué me refiero.

A mis hermanos, la Negra y el Negro que sé que junto a ellos nada me faltaría.

De igual manera, esta tesis también es vuestra.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	3
Predisposición Genética.....	3
Prevalencia de la Enfermedad Celiaca.....	4
Etiología y Patogénesis de la Enfermedad Celiaca.....	4
Microbiota y Enfermedad Celiaca.....	7
Microbiota y Ácidos Grasos de Cadena Corta.....	11
Dieta sin Gluten y Dieta de los Niños Sonorenses.....	14
III. HIPÓTESIS.....	16
IV. OBJETIVOS.....	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Particulares.....	17
V. PARTICIPANTES Y MÉTODOS.....	18
Diseño del Estudio y Participantes.....	18
Evaluación Antropométrica.....	19
Evaluación de Dieta.....	19
Genotipificación.....	19
Análisis de Anticuerpos.....	21
Composición de la Microbiota Fecal de los Niños con EC y Sanos.....	22

CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Página
Extracción, Identificación y Cuantificación de Ácido Láctico, Acético, Propiónico y Butírico.....	23
Análisis Estadístico.....	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
Características de los Niños Sonorenses en Estudio.....	25
Dieta de los Niños Sonorenses en Estudio.....	30
Microbiota y Producción de Ácidos Grasos de Cadena Corta de los Niños en Estudio.....	35
Factores Perinatales, Dieta, Microbiota y Producción de Ácidos Grasos de los Niños en Estudio.....	44
Descripción de un Caso Familiar Derivado de un Participante Enfermo.	46
VII. CONCLUSIÓN.....	54
VIII. REFERENCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Porcentaje de grasas totales y saturadas en la dieta de los niños en estudio.....	32
2	Porcentaje de carbohidratos y proteínas en la dieta de los niños en estudio.....	33
3	Consumo de azúcares simples y fibra en la dieta de los niños en estudio.....	34
4	Porcentaje de <i>Bacteroides</i> en la microbiota fecal de los niños en estudio	37
5	Concentración de acetato en las muestras de heces fecales de los niños en estudio.....	39
6	Concentración de propionato en las muestras de heces fecales de los niños en estudio.....	40
7	Concentración de butirato en las muestras de heces fecales de los niños en estudio.	40
8	Concentración de lactato en las muestras de heces fecales de los niños en estudio.	42
9	Árbol genealógico del caso índice y familia extendida, presencia de asma bronquial y participantes con criterios diagnósticos para EC.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Iniciadores de secuencia específica para HLA DQ2/DQ8.....	20
2	Edad, sexo, IMC, estado de nutrición de los niños en estudio.....	26
3	Factores perinatales asociados al desarrollo de enfermedad en niños sonorenses en estudio.....	27
4	Signos y síntomas, predisposición genética y anticuerpos de los niños sonorenses en estudio.....	29
5	Comparación de la concentración de ácidos grasos de cadena corta en los niños participantes del estudio.....	43
6	Edad, sexo, haplotipos, anticuerpos e IMC de la familia extendida del caso índice.....	50
7	Síntomas intestinales de la familia extendida del caso índice.....	51
8	Signos y síntomas extra-intestinales de la familia extendida del caso índice.....	51

RESUMEN

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía autoinmune, asociada a genética, con el gluten como primer ofensor. Además, la dieta general y otros factores, influyen en la microbiota y su producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), afectando la integridad del epitelio intestinal. El objetivo de la tesis fue, evaluar historial clínico familiar, dieta, proporción de *Bacteroides* y concentración de acetato, propionato y butirato, en heces de niños sonorenses celiacos y saludables. Se aplicaron entrevistas del historial, se identificaron los haplotipos HLA-DQ2/DQ8 por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y los anticuerpos IgA anti-gliadinas y anti-transglutaminasa por ELISA. La proporción de *Bacteroides* en heces se evaluó por qPCR, la concentración de AGCC por HPLC/MS y la dieta por recordatorio de 24 h. Participaron 7 niños con EC y 7 sanos pareados. Los casos tenían mayor proporción de *Bacteroides* ($p=0.015$), pero menor concentración de propionato ($p=0.015$) y butirato ($p=0.01$) que los sanos. La proporción de *Bacteroides* correlacionó moderadamente a la inversa con el consumo de carbohidratos ($r= -0.56$, $p<0.05$). Participaron 12 familiares de uno de los casos de EC, 8 tuvieron HLA-DQ2 y 9 fueron positivos a anticuerpos anti-transglutaminasa; compartían factores ambientales entre ellos y 6 tenían diagnóstico de asma. Los niños sanos tienen menor proporción de *Bacteroides* en su microbiota, asociada al consumo de carbohidratos en la dieta, y mayor concentración de propionato y butirato, respecto a los celiacos. En la familia, los factores ambientales, la genética y el asma, pudieran ser determinantes en el riesgo y desarrollo de EC.

Palabras clave: enfermedad celiaca, microbiota, *Bacteroides*, ácidos grasos de cadena corta, antecedentes familiares.

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is an autoimmune enteropathy associated to genetics, with gluten as the first trigger. In addition, general diet and other factors change microbiota and its short chain fatty acids (SCFA) production, affecting the intestinal epithelia integrity. The objective of this thesis was to evaluate the clinic and family history, diet, *Bacteroides* proportion and SCFA concentration in feces of Sonoran healthy and CD children. Clinic history was obtained by interview; HLA-DQ2/DQ8 haplotypes were identified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and IgA anti-gliadin and anti-transglutaminase antibodies by ELISA. *Bacteroides* proportion in feces was evaluated by qPCR, SCFA concentration by HPLC/MS and diet by 24 h recall. Participants were 7 CD and 7 matched healthy children. CD children presented higher proportion of *Bacteroides* ($p=0.015$), but lower propionate ($p=0.015$) and butyrate ($p=0.01$) concentration than the healthy children. *Bacteroides* proportion correlated moderately inversely with carbohydrate intake ($r= -0.56$, $p<0.05$). In addition, 12 relatives of a CD child, were studied. HLA-DQ2 was prevalent in 8/12 and 9/12 were positive for anti-transglutaminase antibodies; they shared environmental factors and six suffered asthma. Healthy children had lower *Bacteroides* proportion associated to carbohydrate intake and higher concentration of propionate and butyrate, than CD children. Shared familiar environmental factors, genetics and asthma, could increase risk for CD development.

Key words: celiac disease, microbiota, *Bacteroides*, short chain fatty acids, diet, family antecedents.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía autoinmune de etiología multifactorial, que se desencadena por la ingestión del gluten en personas con predisposición genética. Sus síntomas son variados, desde los gastrointestinales en la niñez temprana, como los extra-intestinales en la mayoría de los casos (Ludvigsson *et al.*, 2013). Considerada hasta hace poco un padecimiento raro, se ha convertido en una enfermedad común, quizá asociada a la dieta y estilo de vida actuales (Cenit *et al.*, 2015).

La globalización ha difundido el consumo de comida rápida, muy alta en grasa saturada y reducida en fibra dietética, modificando la dieta de las poblaciones alrededor del mundo. Esta dieta afecta la microbiota, que es el conjunto de millones de microorganismos en el cuerpo, especialmente en el tracto intestinal (De Filippo *et al.*, 2010). Del equilibrio en la composición de la microbiota, depende la salud debido a su capacidad de fermentar nutrientes, sintetizar vitaminas y modular el sistema inmune (Kamada *et al.*, 2013).

Los cambios en la microbiota, pueden llevar a disbiosis, aumentando la proporción de bacterias productoras de metabolitos, como el tipo de ácidos grasos de cadena corta, que afectan la integridad de la barrera intestinal. Así, se facilita la internalización de antígenos, que desencadenan respuesta inmune anómala (Chung *et al.*, 2016; Davis-Richardson y Triplett, 2015). Quizás esto ha contribuido al aumento en la prevalencia de enfermedades autoinmunes, como lo es la EC. Actualmente, el único tratamiento para la EC es una dieta sin gluten de por vida; si no es lo suficientemente estricta, no remiten los síntomas y se agrava la condición (Wacklin *et al.*, 2014).

Debido a que la genética, la composición de la microbiota y la dieta varían entre una población y otra, es importante caracterizar estos factores en diversas regiones del mundo (De Filippo et al., 2010). Los niños del noroeste de México que padecen EC, son la población de estudio propuesta. Una vez identificadas las bacterias involucradas, los ácidos grasos producidos y su asociación con la dieta, se podría modular la dieta para evitar desbalances en la microbiota y en las concentraciones de AGCC. La intención del estudio fue identificar factores heredofamiliares de riesgo, asociar la dieta, microbiota y metabolitos producidos por ella en niños sonorenses con EC, en comparación con sanos.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Predisposición Genética

Es condición para la manifestación de la EC, la predisposición genética dada por los heterodímeros HLA-DQ2.5 (DQA1*0501; DQB1*0201) y/o HLA-DQ8 (DQA1*0301 y DQB1*0302/303) (Sollid *et al.*, 2012). Estos haplotipos los presenta el 30-35% de la población general; sin embargo, solo el 2-5% de los portadores podría desarrollar la enfermedad (Rossi y Schwartz, 2010). Por ello, la predisposición genética y el gluten como factor desencadenante, son necesarios, pero no suficientes para que la EC se desarrolle, debido a que su etiología es multifactorial (Sollid *et al.*, 2012).

En una cohorte europea, el 88% de los casos con EC eran portadores del HLA-DQ2.5, mientras que solo el 6% presentó el -DQ8 y el 5.6% presentó solamente uno de los alelos del -DQ2.5 (4% DQB1*0201; 1.6% DQA1*0501) (Karell *et al.*, 2003). A diferencia de las poblaciones europeas, en población amerindia con EC, es más común el haplotipo HLA-DQ8 (Araya *et al.*, 2000). En Sonora, México, se encontró ligeramente más prevalente este último que el HLA-DQ2 en los casos de EC, pero con la combinación DQ8/DQB1*0201, se incrementa el riesgo a 1:6 en comparación al 1:9 de cuando se encuentra solo el DQ8 (Mejía-León *et al.*, 2015).

Prevalencia de la Enfermedad Celiaca

Aunque hasta hace pocos años se consideraba que la EC principalmente afectaba a la población caucásica donde su prevalencia va desde 1:200 hasta 1:100 (Ludvigsson *et al.*, 2014), ahora se reconoce en cualquier población. En algunos países de Latinoamérica, como Chile y Argentina, la prevalencia para EC es de 1:167 (Araya *et al.*, 2015), similar a lo estimado para México (1:168), (Remes-Troche *et al.*, 2013). En una revisión sistemática para conocer la prevalencia de EC en esta región del mundo, se encontró que va desde 1:217 hasta 1:156, un escenario similar al observado en Europa. Según los autores de la revisión, quizás la prevalencia sea mayor en Latinoamérica y las limitaciones de diagnóstico se deban a la carencia en el conocimiento de la enfermedad (Parra-Medina *et al.*, 2015).

Como en otras enfermedades autoinmunes, la prevalencia de la EC ha ido en aumento alrededor del mundo, hasta 5 veces en las últimas 5 décadas. Esto, quizá debido a desencadenantes como los cambios a una dieta más occidentalizada en el mundo, así como los estilos de vida y crianza de los niños. Aunque la EC se diagnostica a cualquier edad, los casos clásicos son detectados en la niñez temprana o durante la tercera o cuarta década de vida (Gujral *et al.*, 2012). Por ello, este padecimiento no debe ser considerado una enfermedad rara en la práctica clínica, y debe tratarse como un problema de salud mundial (Remes-Troche *et al.*, 2006).

Etiología y Patogénesis de la Enfermedad Celiaca

La patogénesis de la EC es única, ya que requiere forzosamente la ingestión del gluten dietario, la predisposición genética, la respuesta inmune innata y adaptativa, para que eventualmente se desencadene (Fasano y Catassi, 2012).

El gluten es un conjunto de proteínas del trigo, centeno y cebada, con altas proporciones de los aminoácidos glutamina y prolina; por lo que resisten la digestión gastrointestinal, dejando péptidos de tamaño grande (Sollid *et al.*, 2013). Cuando estos péptidos entran en contacto con la mucosa intestinal, activan los mecanismos de respuesta inmune innata, produciendo citocinas proinflamatorias como IL-8 e IL-15 (Vicentini *et al.*, 2015). IL-8 atrae a los neutrófilos a la lámina propia, mientras que IL-15 actúa de manera paracrina induciendo la activación del factor de transcripción NF-kappaB en células adyacentes, para incrementar aún más su producción (Arranz *et al.*, 2012). Además, IL-15 incrementa la citotoxicidad dependiente de granzima y perforina por los linfocitos intraepiteliales (IEL), induciendo inflamación. Así, los enterocitos expresan moléculas MICA/B y HLA-E (MHC-I) ligandos de los receptores NKG2D y CD94/NKG2C de los IEL, que en conjunto con IL-15, afectan las uniones estrechas, perturbando la permeabilidad intestinal (Pagliari *et al.*, 2013; Arranz *et al.*, 2012).

Al afectarse la permeabilidad intestinal, ingresan los péptidos de gran tamaño del lumen a la lámina propia, donde son deamidados por la transglutaminasa tisular, que convierte los residuos de glutamina en ácido glutámico. Una vez deamidados, los péptidos adquieren carga negativa, lo que aumenta la afinidad a las moléculas DQ2/DQ8. Así, son captados por las células presentadoras de antígeno, donde son procesados y presentados en el contexto HLA-DQ2/-DQ8 a las células TCD4+, que producen una respuesta inflamatoria tipo Th1, con dominio de IFN- γ (van Bergen *et al.*, 2015).

Las células TCD4+ en la lámina propia inducen la captura del péptido o al complejo formado entre el péptido y la transglutaminasa tisular por las células B. Así, cada célula B puede procesar y presentar cierta fracción del péptido o del complejo a las células T en el contexto de HLA-DQ2/-DQ8. Las células T secretan factores de crecimiento estimulando a las células B para incrementar la producción de anticuerpos anti-gliadinas y anti-transglutaminasa tisular,

estableciéndose la autoinmunidad. El daño a la mucosa intestinal posterior, se caracterizará por linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas y atrofia de los enterocitos (Elliot, 2014).

Una vez establecida la enfermedad, pueden presentarse síntomas y signos de malabsorción como diarrea, esteatorrea, pérdida de peso y retardo en la velocidad de crecimiento de los niños (Ludvigsson *et al.*, 2013). En algunos casos la manifestación clínica no es meramente intestinal, sino extraintestinal como anemia, osteoporosis, artritis, dermatitis herpetiforme, manifestaciones neurológicas, retraso de la pubertad, y daño en otros órganos por activación del sistema inmune adaptativo (Leffler *et al.*, 2015). Por ello, es importante que quien atienda a las personas con o sin antecedentes familiares de la EC, indague en los síntomas y signos intestinales y extraintestinales descritos.

El estándar de oro para el diagnóstico de EC es la biopsia duodenal, para contar linfocitos intraepiteliales y observar la morfología de la mucosa intestinal. Sin embargo, es un procedimiento invasivo y en ocasiones una mucosa normal puede parecer atrofiada cuando el corte histológico no está adecuadamente orientado. Por ello, se pueden considerar 4 de 5 criterios para el diagnóstico de EC, estos son: la presencia de síntomas típicos, serología IgA específica con títulos altos, predisposición genética, biopsia intestinal y respuesta a la dieta sin gluten (Catassi y Fasano, 2010).

Actualmente, el único tratamiento para la EC es llevar una dieta exenta de gluten de por vida para aliviar síntomas, evitar complicaciones y mejorar la calidad de vida. Sin embargo, en algunos casos aún la dieta sin gluten más estricta, no alivia los síntomas. En los últimos años, con el conocimiento de que la microbiota intestinal está estrechamente involucrada en la salud y la enfermedad, se ha buscado abonar al conocimiento de la patogénesis, estudiando la composición de la microbiota en EC. Así, se han encontrado diferencias alrededor del mundo entre la microbiota intestinal de enfermos

celiacos sintomáticos y asintomáticos en dieta sin gluten (Wacklin *et al.*, 2014). También, se han encontrado diferencias en la conformación de la microbiota en personas con la EC activa y las saludables (Nistal *et al.*, 2012a).

Microbiota y Enfermedad Celiaca

El organismo humano alberga 39 trillones de células bacterianas, de las cuales la mayoría residen en el tracto gastrointestinal y se denomina microbiota intestinal (Sender *et al.*, 2016). Ésta, es capaz de realizar funciones como digestión y fermentación de nutrientes, regulación de la permeabilidad intestinal y maduración del sistema inmune (Kamada *et al.*, 2013).

Algunos factores intrínsecos como la motilidad intestinal, la producción de ácido clorhídrico y sales biliares; y extrínsecos como los antibióticos y la dieta, son capaces de ocasionar cambios en la composición de la microbiota (Vangay *et al.*, 2015). Korpela *et al.* (2016), encontraron que los tratamientos con antibióticos impactan negativamente la riqueza y diversidad de la microbiota en el largo plazo. Por su parte, David *et al.* (2014), describieron que el consumo de una dieta alta en fibra, baja en grasa y proteína de origen animal, produce grandes cambios en la microbiota intestinal. Es decir, la estructura de la microbiota es moldeable y susceptible ante cambios ambientales. Cualquier alteración que conduzca a un cambio aberrante (disbiosis) de la composición o estructura equilibrada (eubiosis) de la microbiota, puede afectar la respuesta inmunitaria (Kamada *et al.*, 2013).

Cada vez hay más evidencia de la importancia de la microbiota intestinal, la producción de sus metabolitos secundarios y la disbiosis existente en personas de diferentes países y grupos etarios, con EC. Tal es el caso de niños españoles con EC activa, cuya proporción de *Bacteroides*, *C. histolyticum* y bacterias reductoras de sulfato, fue mayor en su microbiota fecal que la de los

niños sanos. Estas diferencias en los niños con EC podría haber contribuido al incremento de la permeabilidad intestinal y permitido la internalización de antígenos como los del gluten (Collado *et al.*, 2007). Las mismas bacterias se han encontrado en pacientes con el síndrome del intestino irritable, asociadas a la distensión abdominal (Shukla *et al.*, 2015), síntoma clásico en la EC. Además, en el síndrome del intestino irritable el perfil de citocinas es de respuesta celular tipo Th1, incluyendo TNF- α e IL-1 β (Hughes *et al.*, 2013), mismo que se presenta en la EC.

Posteriormente, los mismos autores en la misma población española antes descrita, compararon la microbiota fecal y duodenal de niños sanos y con EC activa, incluyendo esta vez niños con EC tratada. Encontraron que *Bacteroides* y *Clostridium leptum* fueron más abundantes en ambos grupos con EC, que en los saludables, tanto en la microbiota duodenal como fecal, independientemente del estadio de la enfermedad. Además, la proporción de patógenos como *E. coli* y *Staphylococcus* fue mayor en la fase activa de la enfermedad que en los sanos, pero dicha proporción se normalizó después de una dieta sin gluten durante 2 años, a la par de la recuperación de la mucosa intestinal (Collado *et al.*, 2009).

Otro estudio realizado por Sánchez *et al.* (2013) en niños españoles, comparó la microbiota duodenal de niños con EC activa, en tratamiento y saludables. Encontraron que Proteobacterias y algunos miembros de *Enterobacterias* fueron más abundantes en niños con EC activa, en comparación con aquellos en tratamiento y saludables; pero Firmicutes fue mayor en estos últimos que en aquellos con EC activa. En los estudios por Collado *et al.* (2007) y Sánchez *et al.* (2013) utilizaron cultivos en distintos tipos de agar, para evaluar la microbiota. Este procedimiento tiene la limitante de que sólo el 30% de la microbiota intestinal puede cultivarse (Fraher *et al.*, 2012). Quizá sea esta la razón por el que sólo se enfocaron en bacterias muy específicas. Por su parte, con el conocimiento del rol de *Bacteroides* en patologías como la EC, Collado *et*

al. (2009), se enfocaron en cuantificarlo mediante qPCR, una técnica reproducible, sencilla y muy específica (Bergström *et al.*, 2012).

En Italia se comparó la microbiota duodenal y fecal de niños con EC tratados durante 2 años con dieta sin gluten, con la de niños sanos. Se encontró que la diversidad de *Eubacterias* en duodeno fue mayor en los niños con EC que en niños sanos. Además, la microbiota fecal de los niños con EC presentó mayor proporción de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Staphylococcus*, y enterobacterias, que en los niños sanos. Algunas bacterias dentro de este último grupo, pueden mediar la aparición de infecciones a temprana edad (Di Cagno *et al.*, 2011); éstas, pueden afectar la permeabilidad intestinal, dando lugar al desarrollo de EC (Radlovic *et al.*, 2016).

En Finlandia, se comparó la microbiota duodenal de dos grupos de adultos con EC de larga evolución en dieta sin gluten durante 3 años con síntomas gastrointestinales y sin ellos. El grupo con síntomas presentó menor abundancia de Bacteroidetes y Firmicutes, y mayor abundancia de Proteobacterias. Así mismo, los asintomáticos tenían mayor proporción de *Prevotella* y menor proporción de Proteobacteria. Sin embargo, aunque no hubo diferencias entre el consumo de inhibidores de la bomba de protones, 3/17 adultos con síntomas los usaban (Wacklin *et al.*, 2014). En este contexto, es importante considerar un hallazgo reciente por Imhann *et al* (2016), quienes afirman que el riesgo de padecer una infección por *Clostridium difficile* incrementa en un 65% cuando se consumen antiácidos.

En un estudio de españoles adultos y niños con EC tratada o activa, así como sus referentes saludables, se encuentran otras evidencias sobre el efecto de la disbiosis en la microbiota duodenal. En ambos grupos etarios, *Prevotella* y *Streptococcus* fueron más abundantes en los saludables, que en aquéllos con EC activa. Asimismo, los adultos presentaron mayor diversidad en géneros bacterianos, que los niños (Nistal *et al.*, 2012a). Los mismos autores, estudiaron

la microbiota fecal en la misma población. Los adultos con EC activa tenían mayor abundancia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la microbiota fecal que los que recibían tratamiento para EC, e incluso que adultos saludables (Nistal *et al.*, 2012b). Sin embargo, solo se enfocaron en las diferencias entre las especies relacionadas a *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, por lo cual habría que analizar las proporciones de otros géneros como *Bacteroides* que previamente se han encontrado en la microbiota de los celíacos.

Un estudio comparó la microbiota duodenal en niños con EC activa, con diferentes grados de daño en el epitelio intestinal, desde leve (Marsh 2) hasta avanzado (Marsh 3b), así como saludables. No se encontraron diferencias en la diversidad y riqueza microbiana entre los niños con EC y los sanos y la similitud entre bacterias por grado de atrofia intestinal fue del 98%. Asimismo, los niños enfermos independientemente del grado de atrofia en la mucosa, tuvieron una mayor abundancia relativa de *Streptococcus*, *Bacteroides* y *E. coli*, superior a la de los sanos. Debido a que es el único estudio publicado de este tipo y el tamaño de muestra es limitado; los autores no consideran posible afirmar si la atrofia en sus diferentes grados se asocia a los cambios de la microbiota, o solo es consecuencia de la enfermedad (Fernández-Crehuet *et al.*, 2015). Un estudio reciente demostró que IL-15, involucrada en la patogénesis de EC, provoca cambios en la microbiota con disminución de butirato e inducción de colitis (Meisel *et al.*, 2016).

De la información previamente descrita, se puede inferir que es probable que la disbiosis de la microbiota al diagnóstico de la EC, impida la recuperación de la mucosa intestinal. Así, de los cambios debidos a la dieta sin gluten, dependerá la recuperación de la mucosa, como en el estudio de Collado *et al.* (2009) antes mencionado.

Debido a la poca información publicada, no se puede generalizar sobre la estructura de la microbiota intestinal o fecal en la EC, lo único destacable es

que la abundancia de *Prevotella*, podría afectarse en la EC activa e incrementarse la de *Bacteroides*. Como en los niños sonorenses saludables el género predominante es *Prevotella* (37% del total) (Mejía-León *et al.*, 2014), su abundancia se reduciría en aquellos que padecen EC. De esta manera, también se afectaría el equilibrio en la proporción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), en los niños sonorenses con EC, respecto a los saludables.

Microbiota y Ácidos Grasos de Cadena Corta

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son producto final de la fermentación anaerobia bacteriana de los carbohidratos que escapan de la digestión y absorción en el intestino delgado y llegan al colon. Su concentración en el lumen del colón va de 50-140 mM y pueden proveer el 10% de las calorías diarias (Smith *et al.*, 2013; Davis-Richardson y Triplet, 2015). Dicha concentración varía dependiendo de los cambios que ocurren en la composición de la microbiota por su principal modulador, la dieta (De Filippo *et al.*, 2010).

Los AGCC cumplen diversas funciones, por ejemplo, el butirato es principalmente fuente de energía para los enterocitos, además de ser un agente antineoplásico inductor de la diferenciación celular. El propionato es precursor de gluconeogénesis, lipogénesis, y de la biosíntesis de proteínas en el hígado; por su parte, el acetato se utiliza como sustrato para la síntesis de colesterol (De Filippo *et al.*, 2010).

El metabolismo bacteriano tiene tres fases: degradación, fermentación y eliminación de hidrógeno. Las principales bacterias que asumen la escisión de almidones y fibra dietaria en el lumen intestinal son *Prevotella*, *Bacteroides*, y *Ruminococcus spp.* Sin embargo, otra función de *Prevotella* así como de *Akkermansia muciniphila*, es hidrolizar las mucinas, mantener la mucosa intestinal saludable, y en conjunto con las degradadoras de almidón y fibra, proveer el sustrato necesario a las bacterias ácido lácticas.

La etapa de fermentación en el colon está a cargo principalmente de bacterias de las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*, así como los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Akkermansia*. Tanto en la degradación como de la fermentación de sustratos se produce H₂S, y algunas bacterias anaerobias incluso entre las productoras de butirato, son capaces de utilizarlo vía hidrogenasas reversibles y de esa manera eliminarlo (Salonen y de Vos *et al.*, 2014). De no hacerlo, puede incrementar la apoptosis de los enterocitos, la disminución de células caliciformes, producirse ulceración superficial y daño en el ADN (Rajilic´-Stojanovic´, 2013).

Otras bacterias como *Faecalibacterium prausnitzii*, *E. rectale/Roseburia*, se especializan en la producción de butirato, este AGCC induce la síntesis de mucina que protege al epitelio intestinal. A diferencia de *Bacteroides* y *Veillonella*, que partiendo de glucosa o lactato, pueden producir propionato y acetato, que no inducen la síntesis de mucina, por lo cual podría quedar expuesta la mucosa intestinal (Brown *et al.*, 2011). Esto, puede contribuir a disminuir la tolerancia al gluten, ya que se produce inflamación y se perturba la permeabilidad por daño a la mucosa intestinal (Rostami Nejad *et al.*, 2015). Al igual que butirato, la producción adecuada de propionato induce la expresión de células T reguladoras, que disminuyen el proceso inflamatorio. El problema ocurre cuando la producción de dichos ácidos grasos no es la adecuada (Smith *et al.*, 2013; Arpaia *et al.*, 2013).

Si la concentración de butirato desciende en el lumen intestinal, se desestabiliza el factor de transcripción inductor de hipoxia de los enterocitos, que coordina la función de barrera en la mucosa intestinal y se ha asociado a incremento de la permeabilidad e inflamación intestinal (Kelly *et al.*, 2015). Estos cambios dependen de qué tantos nutrientes son absorbidos o fermentados. En el caso de la EC activa, la absorción y digestión se ve limitada por atrofia de las vellosidades en el intestino delgado, y gran parte de los sustratos pasan al colon en donde son fermentados por la microbiota.

Experimentalmente se ha probado que la concentración de AGCC en heces, es superior en los pacientes adultos con EC en comparación con los sanos, siendo acetato el más abundante (Nistal *et al.*, 2012b). Algo similar ocurre en niños; los que padecen EC durante menos de un año, presentan mayor concentración de AGCC en heces, que los niños saludables o que aquellos tratados de EC durante más de un año. Tanto en el estudio de adultos como en el de niños, el acetato fue significativamente más abundante en los que padecen EC con respecto a los sanos. Esto último, se ha asociado con proinflamación, y podría estar repercutiendo en la persistencia de los síntomas (Tjellström *et al.*, 2013).

Tjellström *et al.* (2014), compararon la producción de AGCC en niños con EC activa en dieta sin gluten, incluyendo avena o no en la dieta, durante un año. Encontraron que en los niños en dieta sin gluten y sin avena, disminuyó la concentración de AGCC a los doce meses, contrario a los niños que consumían avena, en los cuales incrementó, siendo acetato el mayoritario. Es probable que la avena modifique la función de la microbiota y mantenga un estado proinflamatorio de la mucosa intestinal en los niños con EC, agravando su condición clínica.

De los alimentos que componen la dieta dependerá la composición de la microbiota y de ahí la producción de AGCC. Un ejemplo sería que las dietas a largo plazo altas en grasas y proteínas incrementan la proporción de *Bacteroides*, mientras aquellas altas en fibra, incrementan *Prevotella* (Wu *et al.*, 2011). Aunque ambos son géneros del filo *Bacteroidetes*, uno es capaz de fermentar y degradar, y el otro solo es encargado de degradar, pero contribuye a mantener la mucosa intestinal saludable (Brown *et al.*, 2011).

Dieta sin Gluten y Dieta de los Niños Sonorenses

La dieta sin gluten es piedra angular en el tratamiento de los pacientes con EC para prevenir complicaciones a largo plazo y mejorar la calidad de vida (Sarkhy

et al., 2015). Aunque tal dieta se puede preparar en casa, cada vez es más amplia la variedad de productos industrializados sin gluten en el mercado, pero estos pueden llegar a costar hasta tres veces más que sus contrapartes (See *et al.*, 2015).

En diversos productos libres de gluten, se reemplazan los carbohidratos complejos, se incrementan los simples, lípidos y proteínas, para mejorar la calidad sensorial del alimento, incrementando el contenido de grasa y disminuyendo el de fibra (Pellegrini y Agostoni, 2015). En ese sentido, un estudio en Australia comparó la pasta, pan y cereales de desayuno con o sin gluten, y se encontró que el pan y la pasta sin gluten tienen menor contenido de proteínas (52 vs 32%, respectivamente) que sus contrapartes. También algunos pasteles sin gluten contenían más azúcares (8.1/100g), y menos grasas saturadas (2.1/100g) que los convencionales, pero con similar contenido energético 351 vs 358 kcal (Wu *et al.*, 2015).

Otra cuestión es que, al tratar el trigo para refinarlo como harina, se pierden minerales, vitaminas liposolubles e hidrosolubles; por esto, los alimentos convencionales a base de harina de trigo, tienen que fortificarse por ley en algunos países (Rojas-Martínez *et al.*, 2011). Para evitar deficiencias de micronutrientes, en México la NOM-086-SSA1-1994 estipula que los productos sin gluten, deben suministrar la misma cantidad de vitaminas y minerales, que sus contrapartes convencionales.

En Sonora, entre los alimentos más consumidos por los niños saludables figuran la tortilla de harina, bebidas azucaradas, huevo frito, carne de res, frituras de maíz y trigo. En promedio el consumo de energía es de aproximadamente 1700 kcal/día; sin embargo, aunque los macronutrientes se encuentran dentro de las proporciones recomendadas, el consumo de grasa saturada es del 12%, aún por arriba del 7% recomendado según la Asociación Americana del Corazón (López-Domínguez *et al.*, 2015; González-Siqueiros,

2008). La dieta de los niños sonorenses tiene características de la dieta occidental típica, es rica en grasas saturadas, almidones y azúcares y baja en fibra. Previamente se ha asociado esta dieta con incrementos en la incidencia de enfermedades intestinales no infecciosas (De Filippo *et al*, 2010).

Cuando se diagnostica EC a los niños, la dieta cambia de manera abrupta, restringiendo todo alimento que contenga gluten del trigo. La adherencia a esta dieta es muy difícil, ya que el niño puede acceder a los alimentos con trigo en su escuela u hogar. Por eso, representa un reto, no solo para el niño, sino para toda la familia (Ferreyra-Corona *et al.*, 2012). Además, no sólo los alimentos pueden contener gluten sino otros productos como la pasta dental, medicamentos, útiles escolares, etc, (See *et al.*, 2015).

Aunque a cualquier edad es importante una dieta equilibrada en macro y micronutrientes, para mantener la salud, en los niños lo es aún más. Los niños además del requerimiento para su metabolismo, necesitan nutrientes para su desarrollo físico y el de sus capacidades mentales. Así, una dieta completa para niños celíacos, se convierte en un verdadero reto no solo para el nutriólogo, sino para los familiares mismos.

HIPÓTESIS

En los niños celíacos sonorenses, prolifera *Bacteroides* en heces, mientras que el butirato se reduce, debido a la dieta y a su condición de salud, respecto a estos indicadores en niños sanos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar los antecedentes familiares, la dieta, la proporción de *Bacteroides* en la microbiota y la concentración de acetato, propionato y butirato, en heces de niños sonorenses celíacos, en comparación a niños saludables.

Objetivos Particulares

En niños con enfermedad celíaca y en niños sanos de Sonora:

- 1) Registrar y analizar el historial clínico, factores perinatales, anticuerpos y haplotipos asociados a EC
- 2) Evaluar y comparar la dieta habitual.
- 3) Cuantificar la proporción de *Bacteroides* de la microbiota fecal.
- 4) Identificar y cuantificar acetato, propionato y butirato en heces.
- 5) Explorar la historia clínica y antecedentes familiares de los niños celíacos, e identificar familiares en riesgo de desarrollar la enfermedad.

PARTICIPANTES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio y Participantes

Se realizó un estudio de casos y controles. Los casos y los de referencia debieron presentar los haplotipos de riesgo genético; autoinmunidad o la EC los casos; los de referencia, sin auto-anticuerpos contra transglutaminasa. Los siete niños con EC y siete del grupo de sanos, fueron invitados a participar, los primeros en la consulta del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y los segundos, en escuelas públicas. Fueron criterio de inclusión, el tener al menos un mes sin antibióticos, firmar el padre o madre el consentimiento informado y responder al historial clínico desarrollado en nuestro equipo de trabajo por Valencia-Tapia, 2015.

Además, se realizó un estudio exploratorio en los familiares de uno de los casos (C1). Se incluyeron doce familiares de primer y segundo grado de un niño con EC (caso índice). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Bioética (CE/016/2014) y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los participantes, firmado por los padres en caso de los menores de 18 años. Se obtuvo una muestra de sangre venosa de cada participante.

Evaluación Antropométrica

Se evaluó el estado de nutrición de cada niño del estudio, realizando las mediciones de peso y talla para la edad, para calcular índice de masa corporal. Una vez obtenidos se clasificaron de acuerdo a los puntajes Z establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2007).

Evaluación de Dieta

Se evaluó el consumo de alimentos y bebidas mediante tres recordatorios de 24-h no consecutivos, considerando un día de fin de semana, de los niños en estudio. Cuando fue necesario se entrevistó a la madre o al encargado de la preparación de los alimentos para estimar las porciones y las medidas caseras usuales, así como el tipo de preparación. Se utilizaron modelos de alimentos, bebidas y sus porciones, con el fin de ayudar al entrevistado a recordar sus consumos (Sanjur y Rodriguez, 1997). El análisis de la dieta se realizó en base al protocolo descrito por Ortega *et al.* (1999), con el fin de obtener los porcentajes de consumo diario de lípidos, proteínas y carbohidratos (fibra y azúcares).

Genotipificación

Se extrajo el ADN genómico siguiendo el protocolo descrito por Aguayo-Patrón *et al.* (2016), a partir de gotas de sangre seca (GSS) recolectadas en papel filtro estéril (Whatman No. 1) de cada participante del estudio. Se utilizó una perforadora para cortar un círculo de 6 mm de GSS y se colocó en un microtubo de 2 mL. Se añadieron 150 μ L de buffer lisis (10 mM Tris-HCl, 320 mM de

sacarosa, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) y se mezcló en un vortex durante 15 min. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 200 µL de H₂O mili-Q, mezclando durante 5 min, en cada uno. Después de los lavados, se añadieron 100 µL de buffer A (100 mM NaOH, 2% Tween® 20) y se incubó a 95°C durante 12 min. Después, se agregaron 100 µL de buffer B (100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA) y se mezcló en vortex durante 10 min. Por último, se retiró el papel filtro y se midió la concentración de ADN en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA). El ADN obtenido se mantuvo en refrigeración (4°C) hasta su análisis.

La identificación de los alelos para los haplotipos HLA-DQ2 (DQA1*0501 y DQB1*0201) y el HLA-DQ8 (DQB1*0301 y DQB1*0302) se realizó con iniciadores previamente diseñados para PCR convencional (Olerup *et al.*, 1993), los cuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores de secuencia específica para HLA DQ2/DQ8

Iniciador	Secuencia	Dirección	Tamaño
DQA1*0501	5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTA3'	Sentido	186 pb
	5'AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC3'	Antisentido	
DQB1* 0201	5'GTGCGTCTTGTGAGCAGAAG3'	Sentido	205 pb
	5'GCAAGGTCGTGCGGAGCT3'	Antisentido	
DQA1*0301	5'TTCACTCGTCAGCTGACCAT3'	Sentido	183 pb
	5'CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT3'	Antisentido	
DQB1*0302/3	5'GACGGAGCGCGTGCGTTA3'	Sentido	122 pb
	5'AGTACTCGGCGTCAGGCG3'	Antisentido	

pb: pares de bases.

De acuerdo al protocolo de Aguayo-Patrón *et al.* (2016) para qPCR, se corrió el protocolo de cuantificación con SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, California, USA). Para cada reacción dúplex se emplearon 12.5 µL de SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, California, USA), 5 µM de cada iniciador, 2 µL de ADN

templado (80-100 ng), y H₂O mili-Q estéril para completar 25 µL de volumen final. Las condiciones de amplificación consistieron en la desnaturalización inicial a una temperatura de 95°C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 61°C por 30 s, y 72°C por 30 s. Al finalizar la reacción, las curvas de disociación tuvieron incrementos de +0.1°C. Los picos de las T_m en las curvas de disociación se utilizaron para identificar la amplificación de los alelos en las reacciones duplex (Aguayo-Patrón *et al.*, 2016).

Análisis de Anticuerpos

Se evaluaron los anticuerpos IgG e IgA anti-gliadinas (anti-Gd) e IgA anti-transglutaminasa (anti-TG), específicos para EC mediante ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), de acuerdo al método desarrollado por Cabrera-Chávez *et al.* (2009). Las microplacas fueron cubiertas con 100 µL (5 µg/mL) de gliadinas o transglutaminasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en buffer de cubierta (100 mM NaHCO₃, pH 9.6), durante toda la noche. Se hicieron tres lavados con 250 µL de PBST (15 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.2% Tween® 20), y bloquearon con gelatina al 1.5% en PBST durante 60 min, en agitación lenta a temperatura ambiente. Después se hicieron tres lavados con 250 µL de PBST, y se incubaron toda la noche con sueros de los participantes (1:50) en PBST, por duplicado. Las placas se lavaron tres veces con 250 µL de PBST/pozo y se incubaron durante 60 min con HRP-conjugado de anticuerpos anti-IgA humano en PBST (1:2000). Después de tres lavados, la actividad de HRP fue desarrollada con 100 µL de 3,3',5,5'-tetratametil-benzidina/por pozo y se añadieron 50 µL de H₂SO₄ 1 M para detener la reacción. La absorbancia fue leída a 450 nm (Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA).

La reactividad de los anticuerpos IgA anti-gliadinas o IgA anti-transglutaminasa de cada suero, fue expresado como índice, usando como referencia sueros de niños sanos sin la presencia de anticuerpos asociados a EC, de la misma

población. Los índices mayores a 1 se consideraron positivos (Cabrera-Chávez *et al.*, 2009).

Composición de la Microbiota Fecal de los Niños con EC y Sanos

Se colectaron muestras de heces fecales de los casos y testigos para extraer el ADNg bacteriano, mediante el kit comercial QuiAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (QUIAGEN, Hilden Germany). Se midió la cantidad de ADN extraído en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Pittsburgh, USA), y la calidad se evaluó en relación de absorbancia 280/260.

Para la cuantificación de *Bacteroides*, se utilizó una técnica validada usando muestras analizadas previamente por pirosecuenciación (Mejía-León *et al.*, 2016). A partir de un cultivo puro de *Bacteroides spp.*, se extrajo el ADN utilizando el DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), para posteriormente diluir seriadamente 1:10 y cuantificar *Bacteroides* mediante el protocolo de curva estándar en qPCR. Las bacterias totales de las muestras se cuantificaron utilizando los iniciadores HDA-1 (ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT) y HDA-2 (GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Walter *et al.*, 2000). Para *Bacteroides* se utilizaron los iniciadores BacDF (AAGGTCCCCCACATTGG) (Manz *et al.*, 1996) y BacDR (GAGCCGCAAACCTTTCACAA) (Franks *et al.*, 1998). A partir de los datos obtenidos de las curvas estándar de bacterias totales y de *Bacteroides*, se calculó la proporción de estos últimos en cada muestra.

Para cada reacción se utilizaron 10 µL de SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, California, USA), 5 µM de cada iniciador, 10 µg de ADN templado y H₂O mili-Q estéril para completar 20 µL de volumen final. Las condiciones de amplificación para bacterias totales consistieron en un ciclo de 50°C por 2 min y 96°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, y 60°C por 1 min. Para la amplificación de *Bacteroides* se usaron 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos

de 95°C por 15 s, 58°C por 30 s y 72°C por 30 s. Todas las reacciones de qPCR se realizaron en un StepOne Plus™ real time PCR system (Applied Biosystems, California, EUA).

Extracción, Identificación y Cuantificación de Ácidos Láctico, Acético, Propiónico y Butírico

La identificación y cuantificación de los ácidos acético, propiónico y butírico, se realizó en base al protocolo de Han *et al.* (2015), con algunas modificaciones; como la identificación y cuantificación de ácido láctico y el estándar interno.

Se pesaron 100 mg de heces y se adicionaron 100 uL de estándar interno a cada muestra antes de disolverlas en 900 uL de acetonitrilo (ACN) al 50% añadiendo 2 balines de vidrio de 4 mm para homogeneizar en vortex durante 5 min. Cada extracción de muestra de los participantes del estudio se realizó por duplicado. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 rpm (4000 g) durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue colectado en un tubo de 2 mL y se almacenó a -20°C hasta su uso. Como estándar interno se utilizó el ácido 2-etil-butírico a una concentración de 250 µM/mL.

Se prepararon diluciones 1:100 para todas las muestras antes descritas, también se preparó una solución madre de cada uno de los estándares (láctico, acético, propiónico, butírico) obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) a una concentración de 250 µM en ACN 50%. Se preparó una solución mezcla con cada uno de los estándares a 20 mM con el mismo solvente 1:20 (v/v). Esta solución se diluyó para obtener concentraciones de 250 µM a 3.9 µM, empleando como punto cero de la curva ACN al 10% + EI 25 µM. Se agregaron 80 µL de cada una en un tubo ámbar de 8 mL, y se mezclaron con 40 µL de 3-NPH·HCL (0.2 M) y 40 µL de una solución con EDC·HCL (0.12 M)-piridina 6%.

Ambas soluciones se prepararon en acetonitrilo acuoso al 50% y la reacción de derivatización se realizó a 40°C durante 30 min. Las soluciones derivatizadas se diluyeron en 3.84 mL de acetonitrilo acuoso al 10%. Posteriormente cada solución fue filtrada a través de un tamaño de poro de 2 µM.

Se utilizó un cromatógrafo Agilent S-1100 acoplado a un espectrómetro de masas (trampa de iones) modelo VL. La separación se realizó en una columna Zorbax 300B-C18 (2.1 x 100 mm, 3.5 µm), utilizando ácido fórmico:agua al 0.5% (solvente A) y ácido fórmico:acetonitrilo 0.01% (solvente B) como fases móviles. El flujo de la columna fue 0.35 mL/min; la columna y el inyector se mantuvieron a 40°C y 5°C, respectivamente. El gradiente de elución binario fue 15% B durante 2 min, 15-55% B a los 9 min, y se mantuvo a 100% de B por 2 min; inmediatamente se cambió y mantuvo con 15% B durante 5 min. Se inyectó un volumen de 10 µL de cada solución, por triplicado. Para el espectrómetro se empleó modo de polaridad negativa, utilizando una fuente de ionización de electro-spray a una temperatura de secado de 350°C; la presión del nebulizador fue de 40 psi y el flujo de gas de secado fue de 9 L/min. El rango de masas fue de 50-250 m/z.

Análisis Estadístico

Se realizó una prueba *de t* para dos muestras independientes, para comparar las medias de la proporción de *Bacteroides*, y la concentración de acetato, propionato y butirato, entre ambos grupos de participantes, con y sin EC. La normalidad de los datos se aceptó por Kurtosis para ambos grupos. Para buscar correlación entre la dieta y la proporción de *Bacteroides*, ácidos grasos de cadena corta y *Bacteroides*, se realizó un análisis del coeficiente de correlación de Pearson. Las diferencias entre grupos se establecieron a un 95% de confianza. Todo esto se realizó utilizando el paquete estadístico NCSS 2007.

Resultados y Discusión

Características de los niños sonorenses en estudio

Se incluyeron 7 niños con EC, 4 niños y 3 niñas, con edades de 3.8 a 17.5 años. Los referentes sanos se parearon en edad y sexo, respecto a los celíacos. Según el indicador IMC/edad, los casos 4 y 7 con EC presentaron sobrepeso y emaciación, respectivamente; mientras que el resto de los participantes tuvieron un adecuado estado de nutrición. Dos de los casos fueron de reciente diagnóstico y el resto tiene al menos 2 años de evolución de la enfermedad (Tabla 2).

Es de esperarse que un niño de reciente diagnóstico de EC se encuentre emaciado, debido a la malabsorción intestinal, como el caso 7. Una vez que siguen la dieta sin gluten, algunos niños como el caso 4, tienden aumentar de peso. La prevalencia de los niños con EC que presentan sobrepeso es de 9.4-21%, mientras que para obesidad es del 0-8.8% (Capriati *et al.*, 2016). Este problema es mucho más notorio en adolescentes; Mariani *et al.* (1998) encontraron que el 50% de ellos presentó sobrepeso por la dieta sin gluten.

Tabla 2. Edad, sexo, IMC, estado de nutrición de los niños en estudio

Participante	Edad/ género	IMC/Edad (Z)	Estado de nutrición	Años de evolución
C1	10 a, M	-1	Adecuado	8
C2	3a 8m, F	-1	Adecuado	2
C3	11 a, M	0	Adecuado	4
C4	6a 5m, F	2	Sobrepeso	3
C5	6a 8m, M	0	Adecuado	3
C6	17a 2m, M	0	Adecuado	Reciente
C7	12 a, F	-2	Emaciado	Reciente
S1	9a 8m, M	0	Adecuado	0
S2	3a, F	0	Adecuado	0
S3	11a 3m, M	1	Adecuado	0
S4	7a, F	1	Adecuado	0
S5	7a, M	0	Adecuado	0
S6	16a 8m, M	1	Adecuado	0
S7	11a 4m, F	0	Adecuado	0

C#: caso con la enfermedad; S#: sanos; M: masculino; F: femenino

En la Tabla 3, se presentan los factores perinatales de los niños estudiados. Sólo uno de los casos y cuatro de los sanos, nacieron por parto vaginal. La cesárea pudo haber influido sobre una colonización de la microbiota, comprometido el sistema inmune e irrumpiendo la tolerancia antigénica, lo que puede inducir alergias y enfermedades autoinmunes (Pozo-Rubio *et al.*, 2013), como en el caso 1. Ninguno de los niños con EC fue amamantado en exclusivo en comparación a los sanos donde cinco sí lo fueron durante al menos cinco meses. Los niños alimentados a base de fórmulas lácteas son colonizados con una mayor proporción de Bacteroidetes y Firmicutes, mientras que aquellos alimentados al seno materno cuentan con más *Bifidobacterium*, *Actinomyces* y *Haemophilus* (Yatsunenکو *et al.*, 2012). En cuatro de los casos con EC y en uno sano, la introducción de cereales fue tardía (Tabla 3).

En general los participantes cursaron por 1-3 ciclos de antibióticos por año; a uno de los niños del grupo con EC le dieron hasta 12 tratamientos anuales, debido a infecciones en vías aéreas (Tabla 3). Korpela *et al.* (2016), informan que el uso de antibióticos provoca cambios en la riqueza y madurez de la microbiota en niños preescolares. Estos cambios perduran a largo plazo,

disminuyendo Actinobacteria e incrementando Bacteroidetes y Proteobacterias. Algunas especies de Bacteroidetes, pueden inducir respuestas pro-inflamatorias en el intestino inmaduro del niño, incrementan la producción de IL-8, atraen neutrófilos, dañan la mucosa intestinal y permiten el paso de antígenos a través de la misma (Wexler, 2007; Pacheco *et al.*, 2015).

Como se puede inferir, los casos tuvieron mayor número de factores asociados al riesgo de padecer EC, que los niños sanos; esto, a pesar de que ambos grupos tenían la misma predisposición genética. Los factores descritos podrían afectar la colonización temprana de la microbiota, alterar la respuesta inmune e inducir pro-inflamación y daño del epitelio intestinal (Canova *et al.*, 2014; Aronsson *et al.*, 2015). El epitelio intestinal afectado puede ser factor que contribuya a desencadenar autoinmunidad (Davis-Richardson y Triplett, 2015).

Tabla 3. Factores perinatales asociados al desarrollo de la enfermedad celiaca en niños sonorenses en estudio.

Participante	Parto	Complicación al parto	Lactancia	Introducción de cereales	Antibióticos (veces/año)
C1	Cesárea	Infecciones	Mixta	6 m	2
C2	Vaginal	Infecciones	Fórmula	5 m	12
C3	Cesárea	Eclampsia	Fórmula	9 m	2
C4	Cesárea	Infecciones Preeclampsia	Fórmula	6 m	2
C5	Cesárea	Placenta desprendida	Fórmula	7 m	3
C6	Cesárea	Sangrado vaginal	Fórmula	8 m	2
C7	Cesárea	Ninguna	Mixta	8 m	2
S1	Cesárea	Ninguna	Materna	6 m	0
S2	Vaginal	Ninguna	Materna	5 m	1
S3	Vaginal	Ninguna	Materna	5 m	0
S4	Vaginal	Ninguna	Materna	5 m	3
S5	Cesárea	Pelvis estrecha	Fórmula	6 m	1
S6	Vaginal	Hipertensión gestacional	Mixta	6 m	1
S7	Cesárea	Ninguna	Materna	8 m	0

C#: caso con la enfermedad; S#: sanos.

En la Tabla 4, se presentan los signos y síntomas al tiempo del estudio, los genes de predisposición genética y la serología de ambos grupos. En nuestro estudio, los síntomas intestinales más frecuentes en los casos fueron distensión y dolor abdominal, seguido de diarrea y meteorismo; los extraintestinales como aftas bucales y anorexia coincidieron en dos de los casos con EC (1 y 7). El síntoma de estreñimiento en ambos grupos no es nada raro en la población de estudio, ya que como se verá más adelante, su ingestión de fibra es muy baja. En la EC, la respuesta inmune aberrante condicionada por el paso de péptidos de gliadinas a la lámina propia, desencadena los signos y síntomas tanto intestinales como extraintestinales por activación del sistema inmune; pero no sin antes afectar la permeabilidad intestinal.

El control de la permeabilidad intestinal es de suma importancia para la recuperación del paciente con EC. Wacklin *et al.* (2014), atribuyen los síntomas gastrointestinales persistentes en pacientes con EC tratada, a disbiosis en su microbiota. Actualmente, diversas estrategias apuntan hacia la modulación de la microbiota y el uso de reguladores de la permeabilidad, como el péptido acetato de lorazítide (Khaleghi *et al.*, 2016).

Todos los participantes presentaron la predisposición genética dada por los haplotipos completos HLA-DQ2 o DQ8; o alguno de los alelos que los conforman. Los casos 1, 3 y 7 de los enfermos y el participante 7 sano, presentaron las combinaciones de mayor riesgo genético para EC en sonorenses, previamente descrito por Mejía-León *et al.* (2015). Respecto al análisis de auto-anticuerpos, los casos 3, 6 y 7 con EC tuvieron índices positivos; dos de ellos fueron de reciente diagnóstico, por lo que se esperaban esos índices. El tercero, no tiene control de la EC, después de más de dos años de diagnóstico. En el grupo de referencia todos fueron negativos en auto-anticuerpos contra transglutaminasa, un criterio de inclusión en el estudio.

Tabla 4. Signos y síntomas, predisposición genética y anticuerpos de los niños sonorenses en estudio

Participante	Signos y síntomas	Haplotipos	Anticuerpos	
			IgA-Gd	IgA-TG
C1	Diarrea, dolor abdominal, aftas bucales y anorexia	HLA-DQ2	0.38	0.31
C2	Diarrea, dolor abdominal, estreñimiento, dientes moteado y fatiga	DQA1*0501	1.21	0.37
C3	Meteorismo, náuseas y cefalea	HLA-DQ8 DQB1*0201	1.19	1.21
C4	Distensión abdominal, estreñimiento y meteorismo	DQA1*0501 DBQ1*0302	0.48	0.3
C5	Diarrea, distensión y dolor abdominal, estreñimiento	DQA1*0501 DQA1*0301	0.68	0.32
C6	Diarrea, dolor abdominal, estreñimiento, meteorismo, cefalea	DQ1*0201	1.43	1.18
C7	Dolor y distensión abdominal, estreñimiento, aftas bucales y anorexia	HLA-DQ2	0.3	1.29
S1	Ninguno	HLA-DQ2 DQA1*0301	1.34	0.39
S2	Ninguno	DQA1*0301	ND	ND
S3	Ninguno	HLA-DQ2 DQA1*0301	2.13	0.53
S4	Diarrea, distensión y dolor abdominal, estreñimiento	DQA1*0501 DQA1*0302	1.96	0.53
S5	Estreñimiento	HLA-DQ8 DQA1*0501	0.25	0.36
S6	Estreñimiento y meteorismo	DQB1*0302	0.47	0.45
S7	Ninguno	HLA-DQ2	2.23	0.37

*índices de anticuerpos (≥ 1 es positivo); IgA-Gd: IgA anti-gliadinas; IgA-TG: IgA anti-transglutaminasa; ND: no disponible; C#: caso con la enfermedad; S#: sanos.

El único tratamiento efectivo para EC es seguir una dieta sin gluten de por vida. La adecuación al tratamiento en los niños, es uno de los principales retos, debido a las modificaciones drásticas en su dieta. Esta situación podría afectar el estado de nutrición en algunos de los casos que no son atendidos de forma adecuada (Mariani *et al.*, 1998). Si el apego al tratamiento es deficiente, puede haber persistencia de síntomas. Tales son los casos 2 y 3 en tratamiento y más de 2 años de evolución en este estudio, podrían estar consumiendo gluten de manera inadvertida, ya que presentan títulos positivos para anticuerpos contra gliadinas. Esto sucede a menudo en los escolares con EC, que comparten alimentos con sus compañeros (Ferreira-Corona, 2012).

En cuanto a los antecedentes, todos los casos con EC tienen familiares con alguna enfermedad autoinmune, como artritis reumatoide, vitiligo o hepatitis autoinmune (datos no mostrados). Mientras tanto, los antecedentes de solo dos de los niños sanos (S4 y S5) muestran enfermedad autoinmune como miastenia gravis y artritis reumatoide. Estos antecedentes, pueden dar idea del riesgo genético, ya que algunas de estas enfermedades presentan la misma predisposición que EC (Lauret y Rodrigo, 2013).

Dieta de los Niños Sonorenses en Estudio

En cuanto a la dieta, los casos 1 y 4 con EC de larga evolución y el participante 3 sano, consumían más grasas totales (Fig. 1) que las recomendadas por la OMS (2015). Aunque los casos 2 y 3 del grupo celíaco, mostraron un consumo adecuado dentro del límite superior tolerable en grasas totales, su proporción de grasa saturada consumida, superó la recomendación, al igual que en los casos 1 y 4. En cambio, sólo el participante sano 3 sobrepasó el 10% recomendado para grasas saturadas. Sin embargo, los casos 1 y 2 consumían más grasa saturada y total, respectivamente que sus referentes sanos ($p < 0.05$). Mientras que el participante sano 7 consumió más grasas saturadas que su referente con EC ($p < 0.05$). Al igual que el participante sano siete, el dos no

consume suficiente grasa total, quizás por esto cumplen con el requerimiento de grasas saturadas (Figura 1). Los participantes sanos 1, 4 y 5 tienen un adecuado consumo de grasas totales y saturadas de acuerdo a la recomendación de la OMS (2015).

Algunos niños con EC por temor a reincidir en síntomas y a fin de eliminar el gluten de la dieta, disminuyen el consumo de cereales que son la principal fuente de carbohidratos, e incrementan el de grasas. Además, en el proceso de elaboración de muchos productos sin gluten, se les añade grasa para proveer características organolépticas (Pellegrini *et al.*, 2015). Los casos 1, 3 y 4 con más de 3 años en evolución consumen habitualmente productos sin gluten como papas fritas, pan y galletas. Los niños en tratamiento consumen más grasas de la recomendación por el consumo habitual de este tipo de productos adaptados para enfermos celíacos (Penagini *et al.*, 2013).

En la Figura 2, se muestra el consumo de carbohidratos y proteínas en porcentaje de energía total consumida por los niños con EC y sanos. Como era de esperarse, el grupo de referencia cumplió con el adecuado consumo de carbohidratos y proteínas en su dieta, exceptuando al participante sano 6, con un consumo un poco menor que el recomendado. Mientras, los niños celíacos 1 y 4 consumen menos carbohidratos de acuerdo a la recomendación (OMS, 2015), pero cumplen con el consumo de proteínas. Los casos 1 y 2 consumen menos carbohidratos que sus referentes sanos ($p < 0.05$). Sólo el caso 7 con EC, mostró estar en el límite inferior adecuado de acuerdo al porcentaje de energía proveniente de proteínas. Éste, fue menor al de su referente sano ($p < 0.05$), lo cual puede verse reflejado en su estado nutricional actual de emaciación, de acuerdo al IMC/edad (puntaje Z de -2).

En conjunto, los casos 1 y 4, con más años de evolución de la enfermedad, presentaron modificaciones en las proporciones de macronutrientes en sus dietas. Limitaban la energía proveniente de carbohidratos, compensando con

grasas totales, y particularmente con el de grasas saturadas. Este es un patrón de alimentación muy común en niños celíacos en tratamiento, ya que tienden a restringir el consumo de carbohidratos e incrementar el consumo de grasa, limitando la ingestión de fibra dietética y micronutrientes (Penagini *et al.*, 2013).

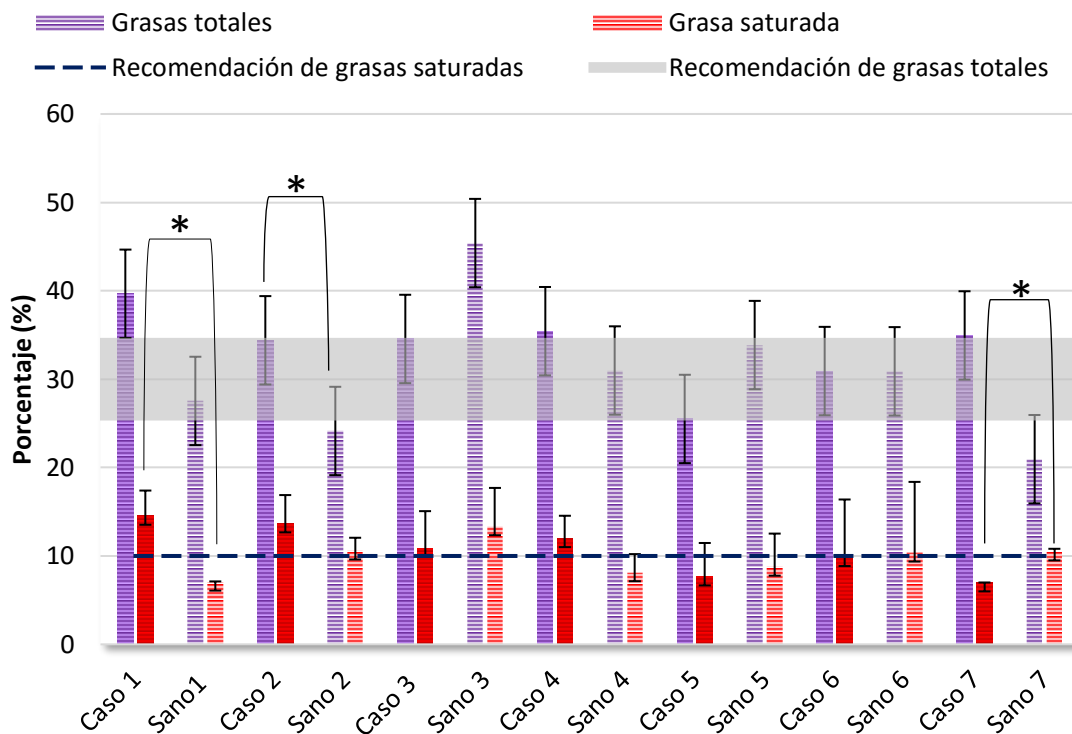


Figura 1. Porcentaje de grasas totales y saturadas en la dieta de los niños en estudio. Trama clara para sanos y obscura para casos. * $p < 0.05$.

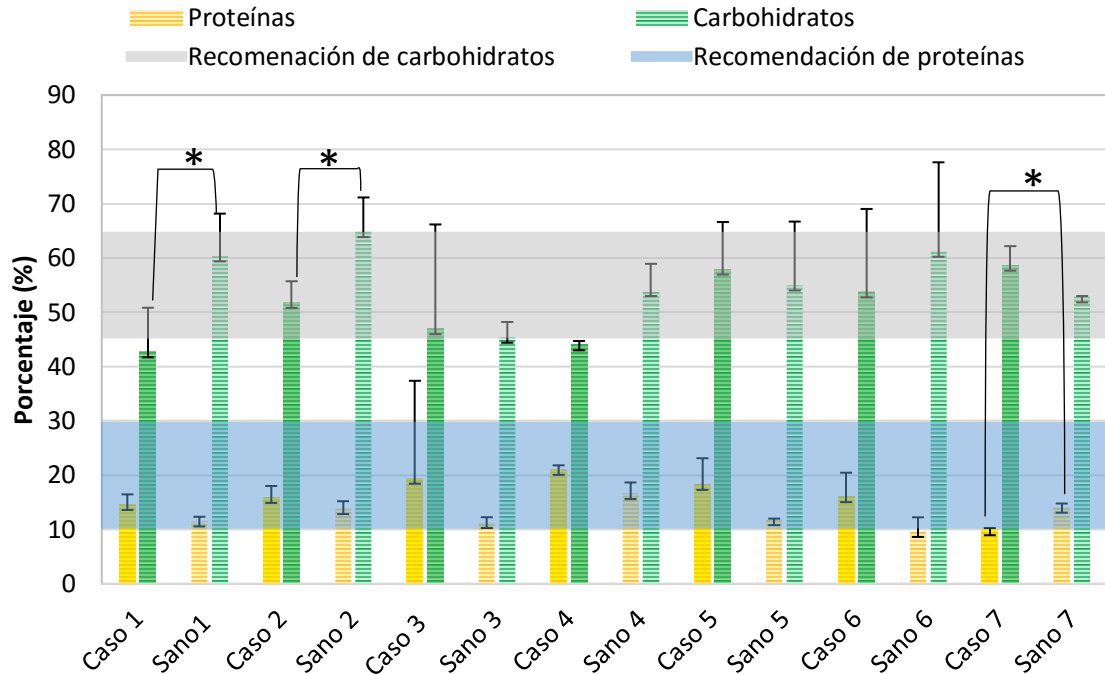


Figura 2. Porcentaje de carbohidratos y proteínas en la dieta de los niños en estudio. Trama clara para sanos y obscura para casos. *p < 0.05.

En la Figura 3, se muestra el consumo promedio de fibra y azúcares simples en la dieta en los niños sanos y con EC. Los casos 1, 2, 5 y 6 con EC consumen una cantidad superior a los 50 g/día de azúcares simples, equivalente al 10% energético total recomendado por la OMS (2015), sólo el participante sano 6 consume más de lo recomendado; mientras que el caso 7 y el sano 4 no llegan al 0.8 y 3 g/día de azúcares, respectivamente. Respecto al consumo de fibra, el caso 1 cumple adecuadamente, de acuerdo a su edad (30 g/día). Los casos 2, 3, 4, 7 y sus referentes sanos no cumplen con la ingestión diaria adecuada (19, 30 y 26 g/día, respectivamente), excepto que el sano 7, al igual que el caso 6 exceden la recomendación de acuerdo a su edad y sexo (AHA, 2006).

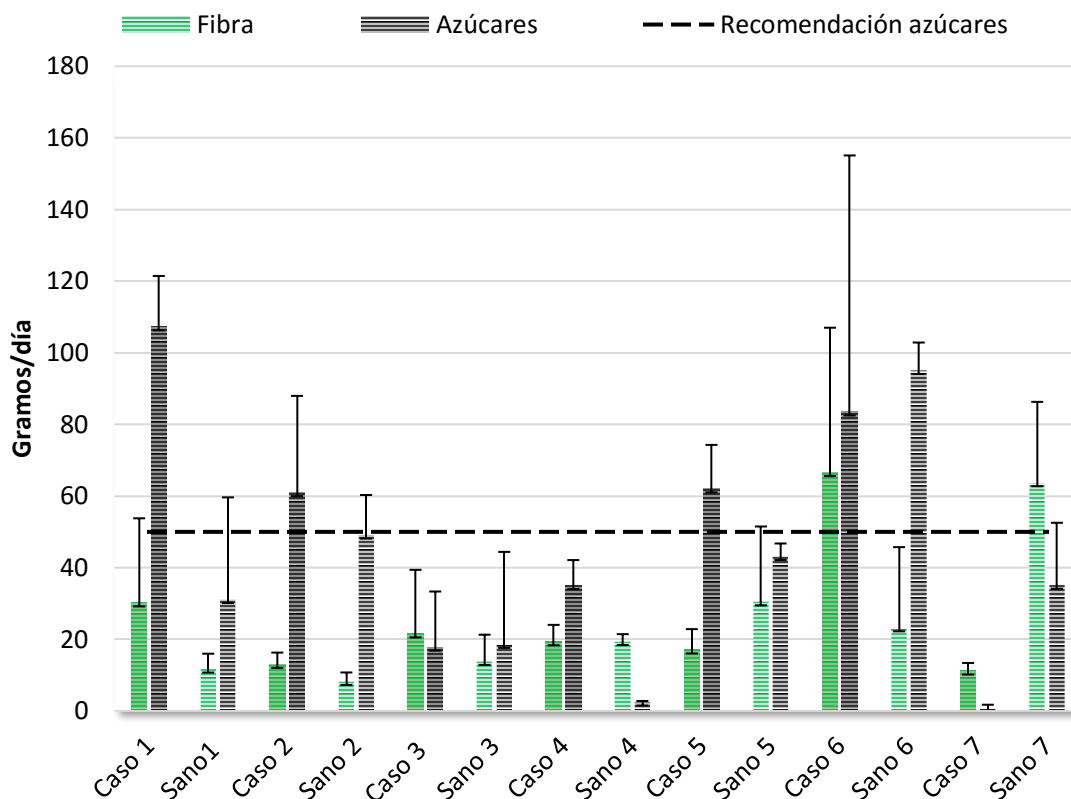


Figura 3. Consumo de azúcares y fibra en la dieta de los niños en estudio. Trama clara para sanos y obscura para casos.

Algunos casos celíacos (1, 2, 5 y 6) consumen más azúcares simples y grasa saturada (1, 2, 3 y 4). Sin embargo, al comparar entre grupos no hubo diferencias entre el consumo de grasas saturadas entre los casos y sanos (10.80 ± 2.85 vs 9.83 ± 2.05 , $p = 0.47$). Asimismo, se comparó el consumo de azúcares promedio entre los dos grupos y no se encontró diferencia entre casos y sanos (52.48 ± 37.20 vs 39.24 ± 29.12 , $p = 0.47$). No obstante, el consumo de proteínas fue mayor en los casos que sus referentes (16.47 ± 3.64 vs 12.69 ± 2.30 , $p = 0.019$).

Un modelo descrito para el desarrollo de autoinmunidad explica que el consumo de estos nutrientes puede modificar la microbiota incrementando la proporción de *Bacteroides* (Davis-Richardson y Triplett, 2015). Algunas especies de este género son capaces de inducir respuestas pro-inflamatorias por el

lipopolisacárido A expresado en su membrana (Wexler, 2007). De esta forma, podría ser factor de riesgo para daño del epitelio intestinal, permitiendo la internalización de antígenos como el gluten, y en personas predispuestas desencadenar la enfermedad. En contraparte a la dieta de los niños celíacos, De filippo *et al.* (2010), encontraron que, a menor consumo de azúcares simples, grasas saturadas y alto consumo de fibra dietética, la microbiota es gobernada por el género *Prevotella*. Dicho género es capaz de modular la adecuada degradación de mucinas y mantener el epitelio intestinal saludable (Brown *et al.*, 2011).

Los casos celíacos 1, 2, 4 y 5, presentaron de manera típica la EC a temprana edad; es probable que los factores perinatales, la dieta y la composición de la microbiota, hayan influido para el desarrollo de la misma. En este periodo, se considera que el niño es más susceptible a infecciones (Walker, 2013), particularmente las intestinales, que afectan la permeabilidad y se han asociado con el desarrollo de EC (Radlovic *et al.*, 2016). Aunque los casos restantes no presentaron EC de manera típica, es posible que el uso de antibióticos y la dieta hayan modificado la microbiota y desencadenado la enfermedad (Brown *et al.*, 2011; Waklin *et al.*, 2014). Es necesario dar seguimiento a la dieta de los niños con EC para evitar el desbalance de nutrimentos, recuperar la integridad epitelial y así remitir signos y síntomas de malabsorción.

Microbiota y producción de ácidos grasos de cadena corta de los niños en estudio

En la Figura 4, se muestra la proporción de *Bacteroides* en la microbiota fecal de los participantes del estudio. Aquellos casos con EC (1 y 4) con más de 3 años de evolución y dieta desequilibrada, con altos consumos de grasas y azúcares simples (caso 1), presentaron la mayor proporción de *Bacteroides* (22 y 36%), muy por arriba de sus contrapartes sanos. Se ha descrito que en la

microbiota fecal de niños con enfermedades gastrointestinales como la EC, tiende a incrementarse la proporción de *Bacteroides* (Fernández-Crehuet *et al.*, 2015). Asimismo, los casos 6 y 7 presentaron 11.5 y 11.38% de *Bacteroides* en su microbiota fecal, proporciones mucho mayores a las de sus contrapartes saludables de la misma edad. Sin embargo, en los casos celíacos restantes la proporción de *Bacteroides* fue comparable con sus referentes sanos. En los niños pequeños como el caso 2 y su referente de 3 años, la composición de la microbiota es muy variable y podría establecerse hasta los 3-5 años de vida (Rodríguez *et al.*, 2015).

El caso celíaco 7 fue detectado mediante un estudio de tamizaje para detección de EC, en una etapa temprana de la enfermedad; es decir, cuando aún no hay manifestaciones metabólicas. Además, su dieta pudiera haber influido en su porcentaje tan bajo de *Bacteroides*, ya que tiene un adecuado consumo de grasas totales y saturadas y bajo consumo de proteínas (Figura 4).

Las diferencias entre las proporciones de *Bacteroides* de los casos con EC y los sanos, parecen asociadas al tiempo de evolución y al desequilibrio de la dieta. Collado *et al.* (2007) encontraron que *Bacteroides*, *C. histolyticum*, *C. cocoides* y bacterias reductoras de sulfato, estaban en mayor proporción en la microbiota fecal de niños con EC activa, que en la de niños sanos. Además, Waklin *et al.* (2014) describieron que la microbiota de celíacos con más de 10 años en tratamiento y con síntomas persistentes, tenía baja proporción de *Prevotella* y elevada de Proteobacterias, comparado con los asintomáticos. Aunque los autores no evaluaron la proporción de *Bacteroides*, esta suele estar relacionada en forma inversa a la proporción de *Prevotella* en la microbiota fecal, como lo fue en nuestra población (Mejía-León *et al.*, 2014). Por esto se podría pensar que en los celíacos sintomáticos al momento de inclusión en el estudio, el género *Bacteroides* podría estar contribuyendo con el incremento de la permeabilidad intestinal y la presencia de síntomas digestivos (Tabla 4).

Bokulich *et al.*, (2016), encontraron que el uso de antibióticos altera la diversidad y retrasa la maduración de la microbiota intestinal en niños. También se ha encontrado en biopsias duodenales y heces de niños con EC activa, un incremento en el número de *Bacteroides spp.* en comparación con sanos (Cenit *et al.*, 2015).

En nuestro estudio, al comparar los promedios de *Bacteroides* entre grupos, los niños con EC tenían una mayor proporción en su microbiota fecal que sus referentes sanos ($p < 0.015$). En un estudio en España de niños con EC, se encontró mayor abundancia de *Bacteroides*, que en niños sanos, cuando se analizó la microbiota duodenal, independientemente del grado de atrofia duodenal (Fernández-Crehuet *et al.*, 2015). El desbalance en la microbiota podría hacer que algunos de nuestros casos sigan con síntomas de la EC, ya que quizás mantenga la permeabilidad aumentada (Waklin *et al.*, 2014).

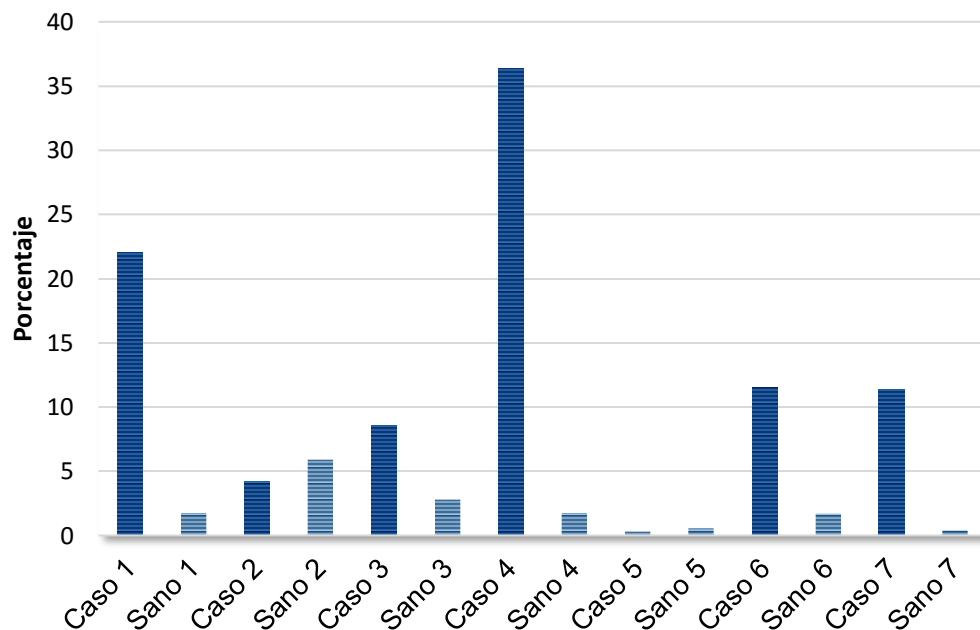


Figura 4. Porcentaje de *Bacteroides* en la microbiota fecal de los niños en estudio. Trama clara para sanos y obscura para casos.

La concentración de AGCC en heces de los participantes se obtuvo mediante protocolo de curva estándar, con las siguientes R^2 , acetato: 0.995, propionato: 0.996 y butirato: 0.991, lo cual se consideró aceptable para la cuantificación.

En cuanto a proporciones de AGCC entre grupos, la concentración molar de acetato: propionato: butirato en las muestras de heces de los casos celíacos fue de 51:23:26, mientras que para los participantes sanos fue de 45:27:28. Se conoce que acetato, propionato y butirato son los AGCC que se producen en mayor cantidad (95%) y su proporción molar en el colon es 60:20:20, respectivamente (Vogt *et al.*, 2003; Cummings *et al.*, 1987).

En la Figura 5 se muestra la concentración de acetato encontrada en cada uno de los participantes del estudio. Los niños sanos tuvieron mayor concentración de este AGCC en comparación con los casos, exceptuando al caso 2. Este caso se destacó por tener una proporción de *Bacteroides* menor a la de su referente sano. Así, que es probable que algún género bacteriano en su microbiota fecal, no evaluada en este estudio, esté contribuyendo a la producción de acetato. Brown *et al.* (2011), describieron que *Bacteroides* y *Veillonella* son capaces de producir acetato y propionato, fermentando glucosa o lactato. Aunque, también se debe considerar que a la edad del caso 2 aún no se cuenta con una microbiota intestinal estable y madura.

El caso 7, con diagnóstico reciente de EC, presentó concentraciones similares de acetato y propionato frente a su referente sano. Probablemente se debió a que no había realizado modificaciones en su dieta. En cambio, para el caso 6 la concentración de propionato es menor a su referente (Figura 6). La diferencia en la concentración de propionato del caso 6 frente a su referente sano, no puede explicarse por diferencias en la proporción de *Bacteroides* (11.5% vs 1.69%) o el consumo de azúcares simples en la dieta (83.5 g/día vs 95.1 g/día). Un análisis detallado del perfil de la microbiota fecal, podría contribuir a explicar el perfil de AGCC producidos, en este caso.

Los casos con más tiempo de evolución (1 y 4) presentaron tendencia similar en concentración de propionato y acetato (Figura 5 y 6). En ambos casos, con concentraciones menores a las de sus contrapartes sanas. Estos niños con EC seguían presentando síntomas gastrointestinales, probablemente debido a que la baja concentración de propionato propicia un estado pro-inflamatorio, al no inducirse la diferenciación de células T reguladoras (Smith *et al.*, 2013).

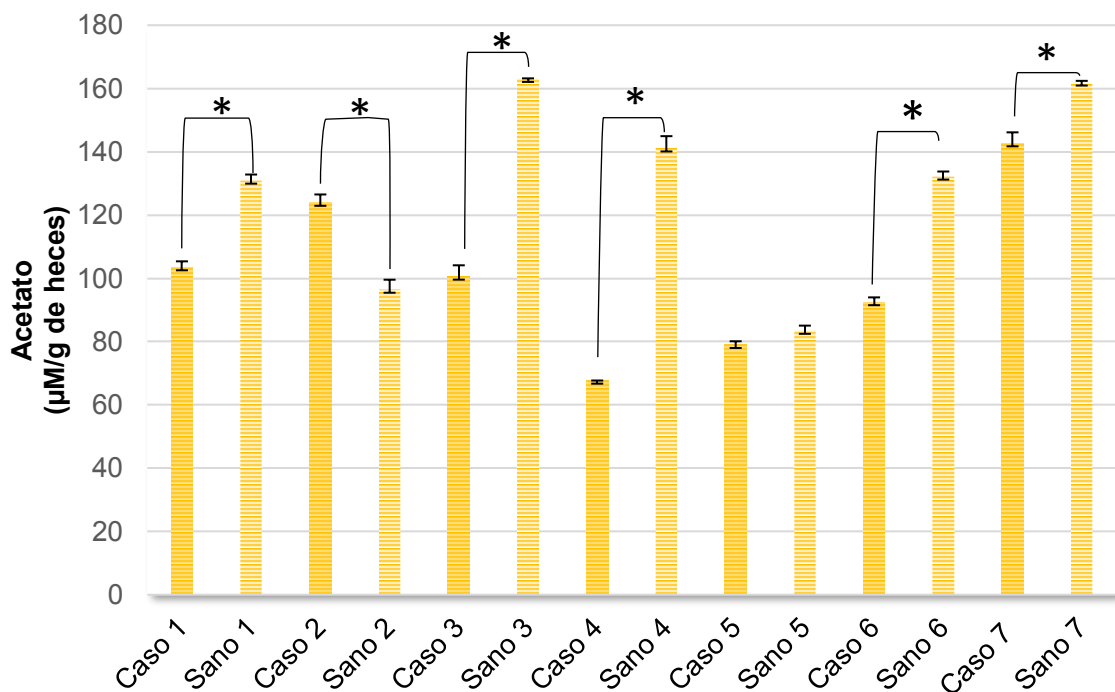


Figura 5. Concentración de acetato en las muestras de heces fecales de los niños en estudio. La trama clara para sanos y oscura para casos. * $p < 0.05$.

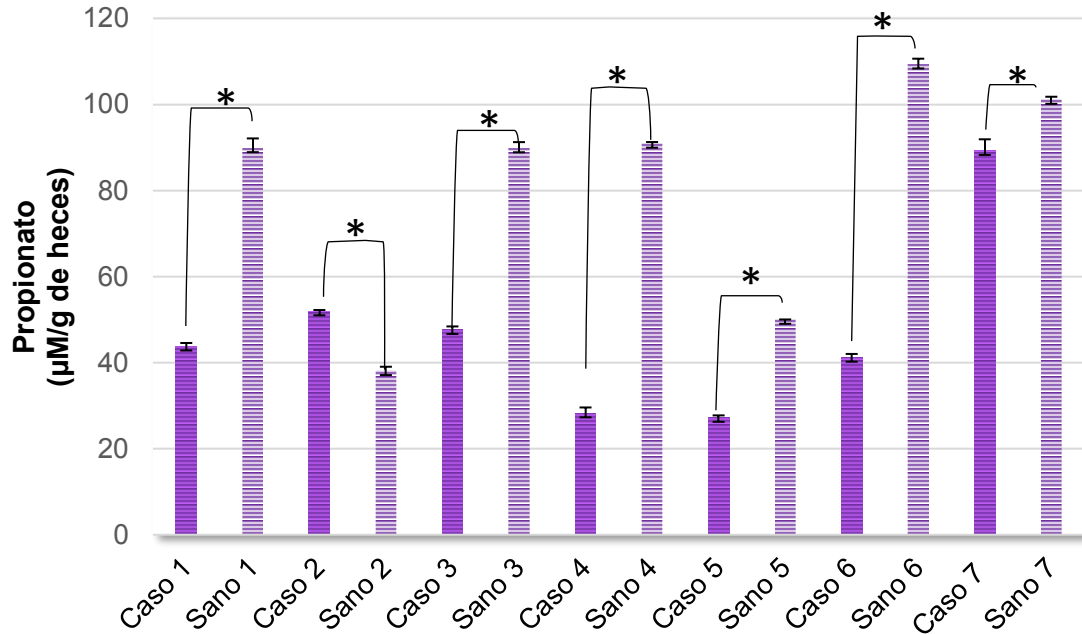


Figura 6. Concentración de propionato en las muestras de heces fecales de los niños en estudio. La trama clara para sanos y obscura para casos. * $p < 0.05$.

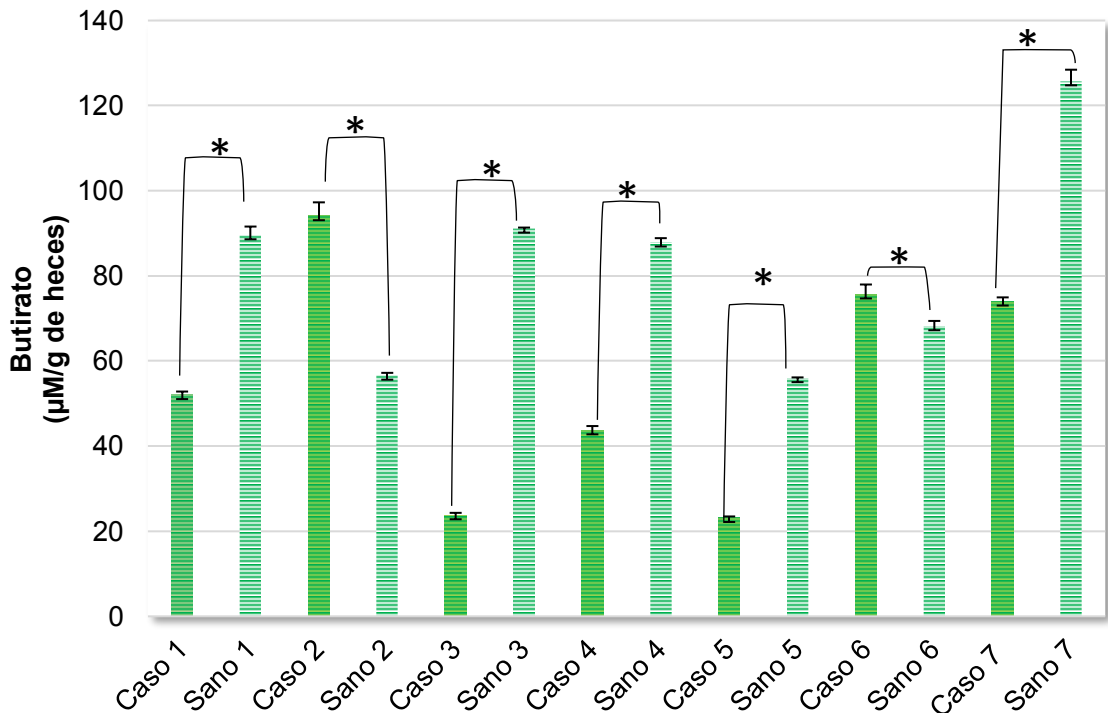


Figura 7. Concentración de butirato en las muestras de heces fecales de los niños en estudio. La trama clara para sanos y obscura para casos. * $p < 0.05$.

En la Figura 7, se muestra la concentración de butirato en las heces de los participantes en el estudio. Como era de esperarse la concentración de este AGCC en los niños con EC fue menor (55.2 ± 27.2 vs 81.2 ± 24.5 , $p < 0.05$) que la de los sanos, a excepción del caso 2 y el 6. Previamente se ha discutido que la edad de este niño, podría ser un factor en la maduración de su microbiota, y por tanto podría influir en la producción de AGCC. Las concentraciones bajas de butirato en el lumen intestinal se han asociado con el incremento de la permeabilidad e inflamación, permitiendo la entrada de antígenos (Kelly et al., 2013), como el gluten.

El butirato es un agente anti-inflamatorio, inductor del factor de transcripción Foxp3 mediando la acetilación de histonas en células T reguladoras. También es capaz de inducir la síntesis de mucinas protegiendo la mucosa intestinal de bacterias y sus productos; además restaura y mantiene saludable las uniones estrechas de los enterocitos (Smith et al., 2013). La mayoría de los casos en estudio tuvieron menor concentración de butirato, por lo cual su epitelio intestinal podría seguir dañado. Inferimos que los casos con >3 años de evolución y tratamiento, presentaron títulos positivos contra gliadinas debido al incremento en la permeabilidad intestinal, y la baja concentración de butirato en su lumen. Butirato es fuente de energía de los enterocitos y ayuda a la diferenciación celular (Tabla 4).

En la Figura 8, se muestra la concentración de lactato en los participantes del estudio. Se observa que los casos 1, 2, 3 y 7 tuvieron menor concentración que sus referentes y solo los casos 4, 5 y 6 mostraron una mayor concentración ($p < 0.05$); mientras que la comparación entre grupos no fue significativa ($p > 0.05$). Chassard *et al.* (2012), describen que lactato es metabolizado rápidamente a butirato o propionato por la microbiota, en personas sanas. En cambio, en personas con síndrome de colon irritable, con estreñimiento, encontraron que las concentraciones de lactato disminuían, así como los niveles de bacterias productoras y utilizadoras de este AGCC como *Eubacterium hallii* y

Anaerostipes caccae. Posiblemente, los casos evaluados en este estudio tengan una menor proporción de bacterias productoras de lactato en su microbiota, debido a las consecuencias de la EC y a modificaciones en su dieta.

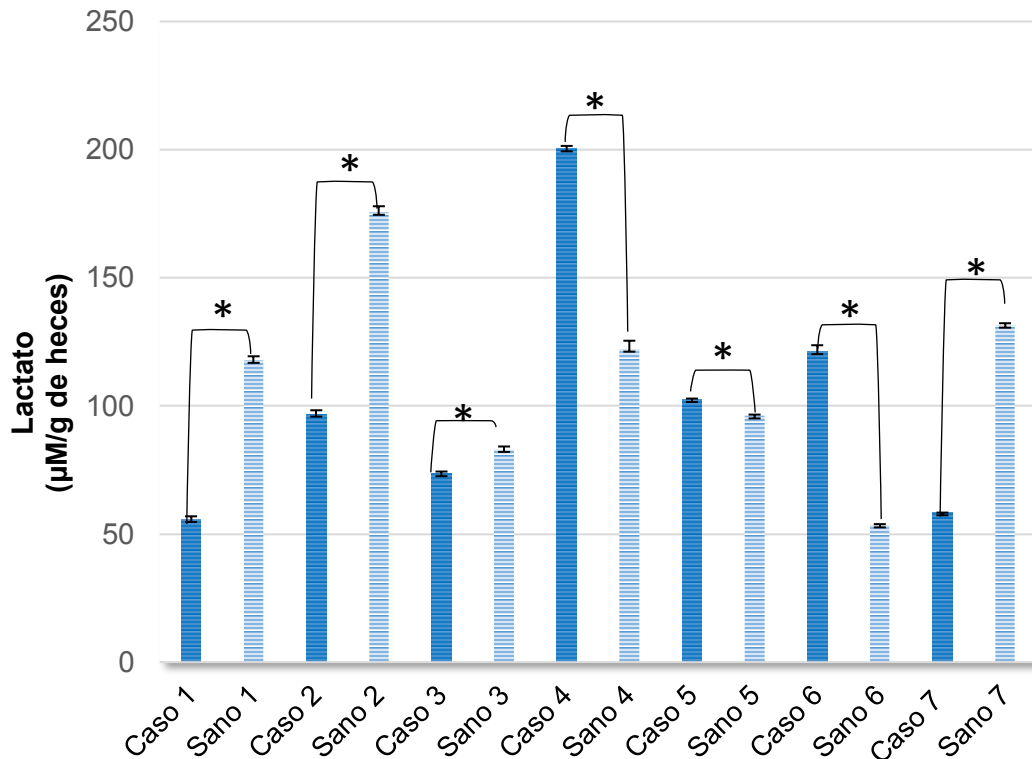


Figura 8. Concentración de lactato en las muestras de heces fecales de los niños en estudio. La trama clara para sanos y obscura para casos. * $p < 0.05$.

Comparando por grupo, los niños sanos tuvieron una concentración mayor de propionato, butirato y del total de AGCC ($p < 0.05$). Acetato fue mayor en los niños sanos que en los casos ($p < 0.05$), mientras que para lactato no se encontró diferencia ($p > 0.05$) (Tabla 5). Contrario a estos hallazgos, algunos estudios han encontrado que los niños y adultos con EC tienen mayor concentración de ácidos grasos en sus heces que los sanos. Nuestro estudio solo coincide en que acetato fue el AGCC más abundante en ambos grupos (Nistal *et al.*, 2012b; Tjellstrom *et al.*, 2013). Tjellstrom *et al.* (2013), asociaron a acetato con pro-inflamación en niños celíacos, lo cual podría repercutir en los síntomas intestinales, impidiendo la recuperación de la mucosa intestinal.

Tabla 5. Comparación de la concentración de ácidos grasos de cadena corta en los niños participantes del estudio.

Ácido graso ($\mu\text{M/g}$ de heces)	Casos con EC ($\bar{x} \pm \text{DE}$)	Sanos ($\bar{x} \pm \text{DE}$)	<i>p</i>*
Lactato	101.2 \pm 49.9	114.3 \pm 37.1	0.5873
Acetato	101.4 \pm 25.6	129.9 \pm 30.4	0.0411
Propionato	47.1 \pm 20.8	81.3 \pm 26.7	0.0100
Butirato	55.2 \pm 27.2	81.2 \pm 24.5	0.0375
Totales	304.9 \pm 58.6	407.7 \pm 75.8	0.0075

* Prueba de t para muestras independientes.

Las concentraciones de ácidos grasos encontradas indican que los niños con EC pueden seguir manifestando síntomas intestinales si no se corrige su dieta, para modular su microbiota. La baja concentración de propionato y butirato puede estar afectando la expresión de Foxp3 en células T reguladoras, induciendo un estado pro-inflamatorio en los casos, a diferencia de los sanos.

En conjunto acetato, butirato y propionato participan en la inducción de mecanismos de defensa del epitelio intestinal, y algunos autores coinciden en que la concentración puede ir desde los 50-140 mM en colon, dicha concentración debe de mantenerse en una proporción estable (Smith *et al.*, 2013; Davis-Richardon y Triplett, 2015).

La menor concentración de AGCC encontrada en los casos de EC en comparación con sanos, podría deberse a desequilibrios en la microbiota, ocasionados por modificaciones en la dieta con el fin de evitar el consumo de gluten (Weber y Polanco, 2012). Caminero *et al.* (2013) observaron que los individuos sanos que consumen 30 g de gluten/día incrementan las concentraciones de acetato, propionato y butirato en heces. Los niños sanos del presente estudio, incluyen gluten de manera habitual en su dieta, como frituras, embutidos, pan y tortillas de harina. Quizás por esto los casos presentaron una concentración menor a la de los sanos.

Factores perinatales, dieta, microbiota y producción de los ácidos grasos de los niños en estudio

De acuerdo a los hallazgos en nuestro estudio, algunos factores perinatales como el nacimiento por cesárea y la falta de amamantamiento, pudieron influir para establecer una microbiota con perfil patogénico, incrementando el riesgo a desarrollar EC (Hakdong *et al.*, 2015). Aunque los participantes sanos 5 y 7, también nacieron por cesárea, un posible factor protector fue el amamantamiento exclusivo durante al menos 5 meses. La leche materna provee primordialmente de anticuerpos IgA secretora, además de factores bactericidas como lactoferrina y componentes anti-inflamatorios (Olivares *et al.*, 2015). En los niños alimentados a base de fórmula, se retrasa la diversidad y maduración de su microbiota en los primeros 12-24 meses de vida, presentando una mayor proporción de Proteobacterias (Bokulich *et al.*, 2016).

Otro de los factores que pudo haber incrementado el riesgo a desarrollar EC es el uso de antibióticos. A diferencia de los casos que tuvieron más de dos y hasta doce tratamientos por año, en los niños sanos solo uno tomaba antibióticos por al menos tres veces al año. Los antibióticos son capaces de modificar la microbiota alterando su composición y también retrasando su maduración, cuando la exposición se da durante los primeros 6-12 meses de vida (Bokulich *et al.*, 2016). Es posible que el caso 2 que ha sido expuesto durante más veces a consumo de antibióticos, presente un retraso en la maduración de su microbiota, lo que la hizo más susceptibles a infecciones respiratorias y gastrointestinales (Korpela *et al.*, 2016; Gensollen *et al.*, 2016).

Existe controversia respecto a si la edad de introducción del gluten en la dieta de infantes se asocia con el riesgo a desarrollar EC. Un estudio en niños suecos, en el cual la edad de introducción fue a los 5.4 meses, en comparación con estadounidenses (7.6 meses), encontró un incremento en el riesgo para el desarrollo de EC (OR: 1.76 [95% CI:1.34-2.24]). Sin embargo, el riesgo no fue

significativo cuando el gluten se introdujo a los 4 o después de los 7 meses, ajustando por país, HLA, género y antecedentes heredofamiliares (Aronsson *et al.*, 2015).

En nuestro estudio, a tres de los casos se les dio gluten entre los 4-6 meses de edad y presentaron EC de manera clásica, entre los 1.7 y 8.8 años, coincidiendo con lo descrito por Aronsson *et al.* (2015). Aunque la mayoría de los participantes sanos consumieron gluten a los 5 meses y sólo uno a los 8 meses, tuvieron amamantamiento a la par de la introducción de cereales. Esto quizás haya sido un factor protector frente al daño de su mucosa epitelial, aunque no se ha encontrado una asociación según la ESPGHAN (Szajewska *et al.*, 2016).

De acuerdo a la dieta y la proporción de *Bacteroides*. Se encontró que algunos de los niños enfermos consumen más azúcares, mientras que los niños sanos exceptuando al 6, cumplen con el consumo adecuado de azúcares simples. Sólo dos participantes del estudio consumen más fibra de lo recomendado para su edad, mientras que el resto no alcanza el mínimo requerido. Los casos 1 y 4 con más tiempo de evolución presentan una mayor proporción de *Bacteroides* en su microbiota fecal. Pero sólo los casos 1 y 4 exceden el consumo recomendado de energía proveniente de grasas totales y saturadas, limitando el de carbohidratos totales. Además, los casos 1, 2 5 y 6 consumen más azúcares simples que la recomendación. Sólo un participante sano consumía más grasa total y saturada de las recomendadas, mientras que ninguno de los referentes consumía menos carbohidratos y proteínas, exceptuando al caso 6, que limita el consumo de proteínas.

En nuestro estudio, no hubo correlación entre la proporción de *Bacteroides* y el consumo de grasa total ($r = 0.36$, $p = 0.19$), de grasa saturada ($r = 0.39$, $p=0.15$), de proteínas ($r = 0.47$, $p = 0.08$), de fibra ($r = 0.010$, $p = 0.99$), ni de azúcares ($r = 0.14$, $p = 0.62$). Sin embargo, se encontró una correlación

negativa moderada entre la proporción de *Bacteroides* en la microbiota fecal y el consumo de carbohidratos en la dieta ($r = -0.56$, $p = 0.03$). Wu *et al.* (2011), encontró que el consumo de algunos componentes de la dieta se asocia con el porcentaje del género *Bacteroides*. Entre estos se encuentran proteína, grasa animal y colesterol que promueven su incremento en el lumen intestinal. Por su parte, el consumo de carbohidratos complejos como almidón resistente promueve el incremento en la concentración de butirato (McOrist *et al.*, 2011). Esto, se asocia a un aumento en la proporción de *Prevotella* y disminución de la de *Bacteroides*, en la microbiota fecal (Wu *et al.*, 2011).

Por otra parte, en el análisis de la concentración de AGCC en relación a la proporción de *Bacteroides*, no se encontraron correlaciones significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, el análisis individual de los casos proporciona evidencia de que el género *Bacteroides* pudiera estar desempeñando un papel importante en la persistencia de los síntomas de EC. Se ha descrito que *Bacteroides* es capaz de fermentar lactato y glucosa, para producir acetato y propionato. Debido a que estos dos AGCC no inducen la síntesis de mucinas, el epitelio intestinal quedaría desprotegido (Brown *et al.*, 2011).

Descripción de un Caso Familiar Derivado de un Caso con EC

En esta parte del estudio participaron 13 personas, incluyendo al caso índice. Éstas fueron los abuelos maternos, madre, hermana, cuatro tías, un tío y tres primos. Ocho de los participantes fueron mujeres y tuvieron una mediana de edad de 36 años (Figura 5). Los trece familiares, como es aún costumbre en algunos lugares de México, convivían en un entorno tradicional habitando casas contiguas o muy cercanas a la de los abuelos. Compartían el ambiente, costumbres de crianza, de alimentación, estilo de vida y tratamiento de enfermedades. Algunas de las prácticas de alimentación durante la infancia, infecciones microbianas y sus tratamientos, pueden influenciar la composición de la microbiota, afectar la mucosa intestinal y eventualmente detonar la EC

(Björck *et al.*, 2016). Esto no sólo ocurre durante la niñez, debido a que también puede tener repercusiones en la vida adulta (Round y Mazmanian, 2009). De tal forma, los miembros de la familia en estudio, comparten condiciones ambientales de riesgo para EC.

Los abuelos de esta familia migraron de una zona serrana rural hacia la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. La segunda generación (madre y tíos del caso índice) vivió su niñez en la zona rural, en un ambiente de granja. Todos refieren haber sido amamantados, pero al mismo tiempo recibieron leche de vaca o cabra. Además, 2 participantes tuvieron nacimientos complicados por no contar con servicios de salud adecuados en la zona rural.

La tercera generación de la familia en estudio (caso índice, hermanos y primos), nació en los alrededores de la ciudad de Hermosillo, en un ambiente no completamente urbanizado. No todas las casas donde habitan tienen servicio de drenaje, ni piso de concreto; además, dentro de los hogares y patios tienen mascotas tales como gatos, perros, gallinas y caballos. Cuentan con mejor acceso a servicios de salud y medicamentos, pero inciden frecuentemente en prácticas de automedicación. Los padres comparten los medicamentos para tratamiento de enfermedades similares que presentan sus hijos y de ellos mismos, la mayoría de las veces sin completar las dosis y/o ciclos adecuados. Todos los miembros de la tercera generación nacieron por cesárea, y ninguno recibió amamantamiento exclusivo durante 6 meses.

A pesar de conocer el diagnóstico del caso índice desde hace 8 años, la mayoría de los miembros de esta familia no estaban conscientes del riesgo a desarrollar EC en el que se encontraban. Se ha descrito que los familiares de personas con EC tienen mayor riesgo de desarrollarla; en los de primer y segundo grado, el riesgo se incrementa en 5.6-10% y 2.3-5%, respectivamente (Lebwohl *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2015). La mayoría de los adultos atribuían sus síntomas a la edad y/o menopausia.

En cuanto a genética de riesgo, 9 de 13 de los participantes presentaron el haplotipo HLA-DQ2 heredado del abuelo, o alguno de sus alelos (DQA1*0501). En dos casos, en combinación con el DQB1*0302 del HLA-DQ8, y en el resto no hubo predisposición (Tabla 5). En población sonoreense el haplotipo más común en casos con EC es el HLA-DQ8 y se incrementa cuando se encuentra en combinación con el alelo DQB1*0201 del HLA-DQ2 (1:6); el HLA-DQ8 solo (1:9); mientras que, el HLA-DQ2 tiene un riesgo de 1:27 (Mejía-León *et al.*, 2015). Por lo contrario, en población Europea el 88% de los casos con EC presenta el haplotipo HLA-DQ2 o sus variantes (Karell *et al.*, 2003), con riesgo promedio de 1:10 (7). Aunque nuestros participantes presentan fenotipo de población mestiza, el fenotipo del abuelo es caucásico.

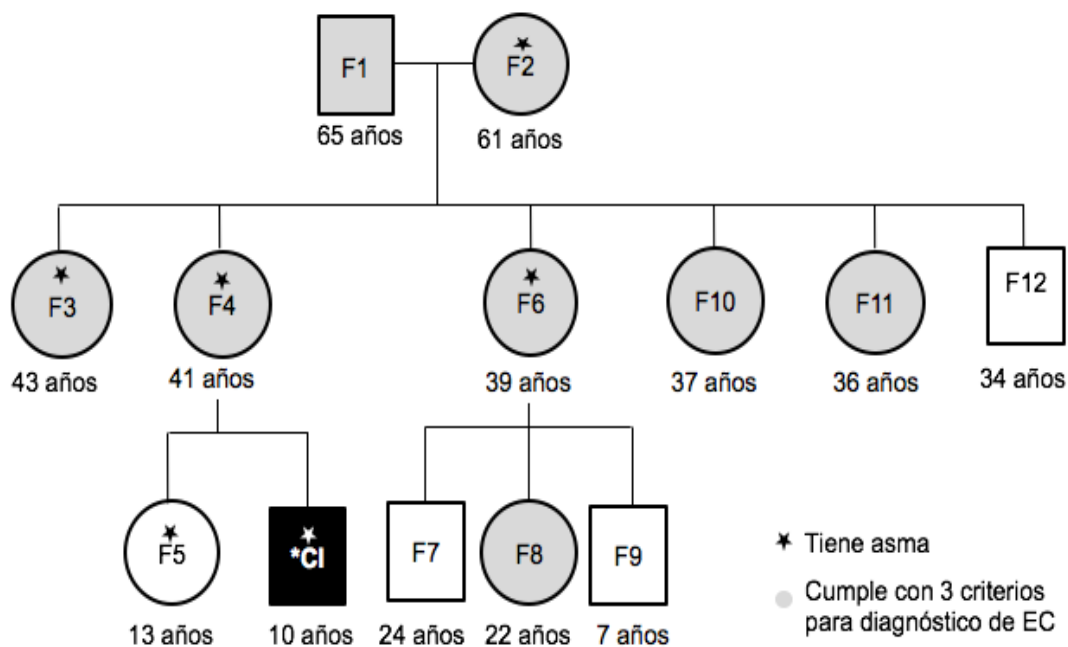


Figura 9. Árbol genealógico del caso índice y familia extendida, presencia de asma bronquial y participantes con criterios diagnósticos para EC. ***CI: Caso índice.** F#: familiar.

El análisis de anticuerpos arrojó índices positivos en siete participantes para IgA contra gliadinas; mientras que para IgA contra transglutaminasa, nueve resultaron positivos lo que representa el 75% de los familiares en el estudio (Tabla 4). Esto, es mucho mayor que el 47% con serología positiva, que

describen Rodrigo *et al.*, (2007) en un estudio familiar. Si consideramos que en población mexicana el 0.6% presenta serología positiva para EC (2), podríamos inferir un alto riesgo de padecer EC en familiares, cuando comparten factores ambientales similares a las de nuestro estudio. De tal forma, se ha descrito una prevalencia combinada del 7.5% en familiares de primer grado y de 2.3% en aquellos de segundo grado (Parra-Medina *et al.*, 2015). En ninguna de estas pruebas presentó positividad el caso índice, debido a que se encuentra en dieta exenta de gluten desde hace 8 años, como tratamiento para EC (Tabla 6).

No se tomaron biopsias duodenales a los familiares, para confirmar diagnóstico de EC, debido a que aunque es el estándar de oro, es invasivo y costoso. En su lugar, tomamos las recomendaciones de algunos autores que proponen el análisis serológico como una opción viable, ya que cuenta con alta sensibilidad y especificidad (98-100%) (Husby *et al.*, 2012). Según Catassi y Fasano (2010), el diagnóstico de EC puede confirmarse si un caso cuenta con al menos cuatro de los cinco criterios siguientes: signos y síntomas típicos de EC, serología positiva, genética de riesgo, atrofia de las vellosidades intestinales (por análisis de biopsia) y la respuesta a la dieta sin gluten. Exceptuando al caso índice (por previo diagnóstico), 8/12 familiares evaluados cumplen con los primeros tres criterios enlistados, faltaría evaluar su respuesta a dieta sin gluten.

De acuerdo al índice de masa corporal (IMC), exceptuando al caso índice, a F9 y F12, los participantes tuvieron algún grado de sobrepeso u obesidad (Tabla 6). Pero podría deberse a talla baja, ya que al igual que el caso índice los familiares la presentaron. Dos de los adultos masculinos estuvieron por debajo del promedio regional (162.7 cm y 165 cm vs. 166.5 cm) (Olaiz, *et al.*, 2006), mientras que la estatura promedio de todas las mujeres fue inferior al promedio regional (131.04 cm vs. 155.7 cm) (Rivera-Dommarco *et al.*, 1999).

Se ha descrito que niños con EC de baja talla, no alcanzan su máxima estatura en la edad adulta (Troncone y Kosova, 2010), en relación inversa con el tiempo

de diagnóstico (Weiss *et al.*, 2008; Sonti *et al.*, 2013). Posiblemente los participantes del estudio padecieron una forma no aguda de EC en la niñez, pudiendo afectar su crecimiento. El caso índice, aunque fue diagnosticado a los 2 años de edad, no recibió un seguimiento adecuado, sino hasta los 6 años.

Tabla 6. Haplotipos, anticuerpos e IMC de la familia extendida del caso índice.

Caso	Edad/ Sexo		Anticuerpos*		IMC	Clasificación
		Haplotipo	IgA-Gd	IgA-TG		
F1	65 M	DQ2, DQA1*0301	0.72	2.40	31.53	Obesidad I
F2	61 F	DQA1*0501	1.31	1.67	28.38	Sobrepeso
F3	43 F	DQ2	1.58	1.54	34.19	Obesidad I
F4	41 F	DQ2	1.51	2.14	28.02	Sobrepeso
F5	13 F	Ninguno	0.87	0.90	26.13	Sobrepeso
CI	10 M	DQ2	0.38	0.31	14.08 [§]	Adecuado
F6	39 F	DQ2, DQB1*0302/3	1.19	1.62	37.26	Obesidad II
F7	24 M	Ninguno	0.78	0.90	26.41	Sobrepeso
F8	22 F	DQ2	1.12	1.33	34.55	Obesidad I
F9	7 M	DQ2, DQB1*0302/3	0.24	0.19	16.25 [§]	Adecuado
F10	37 F	DQ2	1.52	1.42	41.32	Obesidad III
F11	36 F	DQA1*0301	1.34	2.07	28.17	Sobrepeso
F12	34 M	DQA1*0301	0.84	1.07	22.83	Adecuado

*índices de anticuerpos (≥ 1 es positivo). IgA-Gd: IgA contra gliadinas; IgA-TG: IgA contra transglutaminasa. [§]IMC/edad en niños. M: masculino. F: femenino.

Los síntomas intestinales asociados a EC fueron más recurrentes en los familiares estudiados, que los extra-intestinales. En la Tabla 7 se muestra que el síntoma más frecuente fue la distensión abdominal, seguido de intolerancia a alimentos y exceso de gases. Esto coincide con el estudio de Ramírez-Cervantes *et al.*, (2015) en adultos mexicanos mestizos con EC. Además, los participantes F3 y F10 refirieron distensión y dolor abdominal después de consumir alimentos con maíz.

Tabla 7. Síntomas intestinales de la familia extendida del caso índice

Síntomas	n	Casos
Distensión abdominal	10/11	CI, F2, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11
Intolerancia alimentos	9/11	CI, F2, F3, F4, F6, F7, F8, F9, F10
Exceso de gases	7/11	CI, F2, F5, F7, F9, F10, F11
Constipación	6/11	CI, F2, F6, F7, F9, F10
Reflujo gastroesofágico	6/11	CI, F2, F5, F6, F7, F9
Dolor abdominal	5/11	CI, F2, F7, F9, F10
Diarrea	4/11	CI, F7, F9, F10
Nauseas	4/11	CI, F2, F7, F9
Vómito	2/11	F9, F10

En relación a los síntomas extra-intestinales, los participantes presentaron con mayor frecuencia fatiga estrés, ansiedad y trastorno del sueño (9/12 participantes). Otros signos clínicos como urticaria, aftas bucales, esmalte dental moteado y dermatitis, fueron referidos con menor frecuencia (3 a 4/12 participantes) (Tabla 8).

Tabla 8. Signos y síntomas extraintestinales de la familia extendida del caso índice

Síntomas	n	Casos
Fatiga	9/11	F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10
Estrés y ansiedad	8/11	CI, F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10
Trastorno del sueño	8/11	CI, F3, F4, F5, F7, F8, F9, 10
Debilidad	7/11	F2, F3, F4, F5, F6, F7, F9
Cefalea	7/11	F2, F3, F4, F5, F7, F9, F10
Calambres musculares	7/11	F2, F3, F4, F6, F7, F9, F11
Depresión	5/11	F2, F3, F4, F5, F10
Urticaria	4/11	F2, F5, F6, F7
Aftas bucales	3/11	CI, F2, F9
Esmalte dental dañado	3/11	F5, F8, F9
Anorexia	3/11	CI, F7, F9
Dermatitis	3/11	CI, F5, F9
Pérdida de peso	2/11	F4, F11

Un dato interesante, fue que 6/13 de los familiares tenían diagnóstico de asma bronquial (Figura 5), probablemente heredado de la abuela materna. Aunque poco estudiada la relación entre la EC y el asma, hay evidencia de su

asociación. Según Tang *et al.* (2009), los linfocitos intraepiteliales de biopsias de celíacos, expresan más la fosfo-fosfolipasa A2 (p-cPLA₂) citosólica que sus contrapartes sanas. Además, el receptor NKG2D expresado en linfocitos es capaz de activar la vía citosólica intracelular de las p-cPLA₂ en presencia o no de IL-15, y mediar la liberación de ácido araquidónico. Este ácido, es sustrato de las 5-lipoxigenasas y de la leucotrieno C4 sintasa, que conduce a la producción de cisteinil leucotrienos, responsable de la destrucción de los enterocitos. Dicha sobreproducción de leucotrienos induce la inflamación de mucosas, y causa la mayoría de las condiciones inflamatorias, que previamente se han asociado con alergias y asma (Tang *et al.*, 2015). Así, el padecer asma podría ser un factor de riesgo para desencadenar la EC.

Tres de los participantes en el estudio (C1, F3, F5) habían sido tratados con Montelukast para el asma bronquial, pero lo descontinuaron por recomendación médica y actualmente siguen tratamiento con loratadina o clorfenamina. Montelukast, es un fármaco inhibidor de los cisteinil leucotrienos para el tratamiento de los síntomas de asma. Su actividad se ha comprobado *in vitro* en linfocitos intraepiteliales, suprimiendo la citotoxicidad de NKG2D e inhibiendo la producción de cisteinil leucotrienos (Tang *et al.*, 2015). Aunque no ha sido aprobado para el tratamiento de EC, este fármaco es capaz de bloquear a las células T CD8+, responsables de causar daño intestinal. Por eso, se encuentra en ensayo clínico en fase II, la eficacia y seguridad del fármaco para personas con EC (Pilot study of montelukast in celiac disease).

Algunos estudios epidemiológicos también han explorado la relación entre asma y EC. En una cohorte de niños italianos se encontró un incremento en el riesgo a desarrollar EC en aquellos que previamente habían sido diagnosticados con asma (IRR 1.37, 95% IC 1.09-1.71). El uso de antibióticos, que se ha relacionado con ambas enfermedades, no fue un factor de confusión en la asociación (Canova *et al.*, 2015). Al contrario, en una cohorte de población danesa, se concluyó que no hay un incremento en el riesgo de padecer asma si

los padres tienen EC (Andersen *et al.*, 2014). Por esto, se podría considerar el asma como factor predisponente para EC y no viceversa.

La familia naturalmente comparte la genética y antecedentes hereditarios que predisponen a EC. Además, al tener un patrón de convivencia muy estrecho, también comparten factores ambientales que pudieran incrementar el riesgo de desarrollar EC. El haplotipo HLA-DQ2 y costumbres de crianza, alimentación y tratamiento de enfermedades, pudieran ser factores determinantes en el riesgo incrementado de EC que presentó la familia estudiada. Además, otro factor implicado en el desarrollo de EC en varios de los participantes fue el asma, que a través de mecanismos inflamatorios pudiera desencadenar la EC, asociación que hasta ahora ha sido poco estudiada.

CONCLUSIÓN

El tipo de parto, la falta de amamantamiento exclusivo y el número de tratamientos de antibióticos por año, pudo haber mediado el desarrollo de EC en los niños enfermos, ya que los niños sanos presentaron similar genética de riesgo. Pudo comprobarse la hipótesis planteada, ya que los niños sanos, tuvieron una menor proporción de *Bacteroides* en su microbiota fecal asociada al consumo de carbohidratos en la dieta en comparación a los niños celíacos; además, produjeron mayor concentración de propionato y butirato. Sin embargo, las concentraciones de ácidos grasos individuales no se asociaron con la proporción de *Bacteroides*, quizá debido a los diferentes tiempos de evolución y grado de control de los niños con EC, lo cual se reflejó claramente en aquellos con más tiempo de diagnóstico.

Además, los familiares del niño con EC, con la misma carga genética, conviven estrechamente compartiendo condiciones ambientales, patrones culturales y varios padecen asma bronquial; estos factores influyeron para que una mayoría presentara indicadores de EC.

REFERENCIAS

Aguayo-Patrón S., Beltrán-Sauceda L. and Calderón de la Barca A. 2016. A population-wide applicable HLA-DQ2 and DQ8 genotyping using DNA from dried blood spots and duplex allele-specific qPCR amplification. *Scand J Clin Lab Invest.* 57:3574-3579.

American Heart Association, Gidding S.S., Chair B.A., Cochair L.B., Stephen R.D., Matthew W.G., Alice H.L., Karyl T.R, Steinberger J., Stetter N. and Van Horn L. 2006. Dietary recommendations for children and adolescents: A guide for practitioners. *Pediatrics.* 117: 544-559.

Andersen A.B., Erichsen R., Kappelman M.D., Frøslev T. and Ehrenstein, V. 2014. Parental celiac disease and risk of asthma in offspring: a Danish nationwide cohort study. *Clin Epidemiol.* 7:37-44.

Araya M., Mondragón A., Pérez-Bravo F., Roessler J.L., Alarcón T., Rios G. and Bergenfreid C. 2000. Celiac disease in a Chilean population carrying Amerindian traits. *J Pediatric Gastroenterol Nutr.* 31:381-386.

Araya M., Oyarzun A., Lucero Y., Espinosa N. and Pérez-Bravo F. 2015. DQ2, DQ7 and DQ8 distribution and clinical manifestations in celiac cases and their first-degree relatives. *Nutrients.* 7:4955-4965.

Aronsson C.A., Lee H.S., Liu E., Uusitalo U., Hummel S., Yang J., Hummel M., Rewers M., She J.X., Simell O., Toppari J., Ziegler A.G., Krischer J., Virtanen S.M., Norris J.M., Agardh D. and TEDDY STUDY GROUP. 2015. Age at gluten introduction and risk of celiac disease. *Pediatrics.*135:239-245.

Arpaia N., Campbell C., Fan X., Dikiy S., van der Veeken J., deRoos P., Liu H., Cross J.R., Pfeffer K., Coffey P.J. and Rudensky A.Y. 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T cell generation. *Nature.* 504:451-455.

Arranz E., Montalvillo E. y Garrote J.A. 2012. Inmunopatogenia de la enfermedad celíaca, Cap. 9. En: Rodrigo L. y Salvador P.A. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca.* OmniaScience. Primera edición. Barcelona, España. Pp. 123-150.

Bai J.C., Fried M., Corazza G.R., Schuppan D., Farthing M. and Catassi C. 2013. World Gastroenterology Organization global guidelines on celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 47:121-126.

Bergström A., Licht T.R., Wilcks A., Andersen J.B., Schmidt L.R., Grønlund H.A., Vigsnaes L.K., Michaelsen K.F. and Bahl M.I. 2012. Introducing gut low-density array (GULDA): a validated approach for qPCR-based intestinal microbial community analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 337:38-47.

Björck S. Lynch K., Brundin C. and Agardh D. 2016. Repeated Screening Can Be Restricted to At-Genetic-Risk Birth Cohorts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 62:271-275.

Bokulich N.A., Chung J., Battaglia T., Henderson N., Jay M., Li H., D Lieber A., Wu F., Perez-Perez G.I., Chen Y., Schweizer W., Zheng X., Contreras M., Dominguez-Bello M.G. and Blaser M.J. 2016. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med.* 15:343-382.

Brown C.T., Davis-Richardson A.G., Giongo A., Gano K.A., Crabb D.B., Nabanita M., Casella G., Dre J.F., Llonen J., Knip M., Hyöty H., Veijola R., Tuula S., Olli S., Neu J., Wasserfall C.H., Schatz D., Atkinson M.A. and Triplett E.W. 2011. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *Plos One.* 6:e25792.

Cabrera-Chávez F., Rouzaud-Sández O., Sotelo-Cruz N. and Calderón de la Barca A.M. 2009. Bovine milk caseins and transglutaminase-treated cereal prolamins are differentially recognized by IgA of celiac disease patients according to their age. *Agric. Food Chem.* 57:3754-3759.

Caminero A. 2013. Estudio de la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en humanos. Tesis de Doctorado. Universidad de León. León, España.

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

Canova C., Pitter G., Ludvigsson J.F., Romor P., Zanier L. and Zanotti R. 2015. Coeliac disease and asthma association in children: the role of antibiotic consumption. *Our Respire J.* 1:115-22.

Capriati T., Francavilla R., Ferreti F., Castellaneta S., Ancinelli M. and Diamanti A. 2016. The overweight: a rare presentation of celiac disease. *Eur J Clin Nutr.* 70:282-284.

Catassi C. and Fasano A. 2010. Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *Am J Med.* 123:691-693.

Cenit M.C., Olivares M., Codoñer-Franch P. and Sanz Y. 2015. Intestinal microbiota and celiac disease: cause, consequence or co-evolution?. *Nutrients.* 7:6900-6923.

Chassard C., Dapoigny M., Scott K.P., Crouzet L., De'lhomme C., Marquet P., Martin J.C., Pickering G., Ardid D., Eschalier A., Dubray C., Flint H.J. and Bernalier-Donadille A. 2012. Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 35:828-838.

Chung W.S., Walker A.W., Louis P., Parkhill J., Vermeiren J., Bosscher D., Duncan S.H. and Flint H.j. 2016. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol.* 4:3.

Collado M.C., Calabuig M. and Sanz Y. 2007. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol.* 8:9-14.

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

Cummings J.H., Pomare E.W., Branch W.J., Naylor C.P. and Macfarlane G.T. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 10: 1221–1227.

David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Ling A.V., Devlin A.S., Varma Y., Fishbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J. and Turnbaugh P.J. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.* 505:559-563.

Davis-Richardson A.G. and Triplett E.W. 2015. A model for the role of gut bacteria in the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *Diabetologia.* 58:1386-1393.

De Filippo C., Cavalieri D., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., Collini S., Pieraccini G. and Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:14691-14696.

Di Cagno R., De Angelis M., De Pasquale I., Ndagijimana M., Vernocchi P., Ricciuti P., Gagliardi F., Laghi L., Crecchio C., Guerzoni M.E., Gobbetti M. and Francavilla R. 2011. Duodenal and faecal microbiota of celiac children:

molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol.* 11:1-21.

Elliot D.E. 2014. The pathophysiology of celiac disease. in: Rampertab D.S. and Mullin G.E. 2014. *Celiac disease*. English. Springer. Human Press, New York. Pp 39-52.

Fasano A. and Catassi C. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterol.* 120:636-651.

Fasano A. and Catassi C. 2012. Celiac disease. *N Engl J Med.* 367:2419-2426.

Fernández-Crehuet F.G., Tapia-Paniagua S., Morinigo-Gutiérrez M.A., Navas-López V.M., Serrano M.J., Blasco-Alonso J. and Sierra-Salindas C. 2015. The duodenal microbiota composition in children with coeliac disease is influenced by the degree of enteropathy. *An Pediatr.* 84:224-230.

Ferreyra-Corona L. 2012. Seguimiento del estado de nutrición de niños celíacos en dieta sin gluten. Tesis de Maestría. CIAD A.C. Hermosillo, Sonora.

Fraher M.H., O'Toole P.W. and Quigley E.M. 2012. Techniques-used to characterize the gut microbiota a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 9:312-322.

Franks A.H., Harmsen H.J., Raangs G.C., Jansen G.J., Schut F. and Welling G.W. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-Targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 64:3336-3345.

Gensollen T., Iyer S.S., Kasper D.L. and Blumberg R.S. 2016. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science.* 352:539-544.

González-Siqueiros L.E. 2008. Cambios en el patrón de consumo de alimentos y su relación con riesgo de enfermedades crónicas en la población sonorense. Tesis de maestría. CIAD A.C. Hermosillo, Sonora.

Gujral N., Freeman H.J. and Thomson A.B. 2012. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol.* 18:6036-6059.

Han J., Lin K., Sequeira C. and Borchers C.H. 2015. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 854:86-94.

Hughes P.A., Zola H., Penttila I.A., Blackshaw L.A., Andrews J.M. and Krumbiegel D. 2013. Immune activation in irritable bowel syndrome: can

neuroimmune interactions explain symptoms?. *Am J Gastroenterol.* 108:1066-1074.

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

Imhann F., Bonder M.J., Vich Vila A., Fu J., Mujagic Z., Vork L., Tigchelaa E.F., Jankipersadsing S.A., Cenit M.C., Harmnsen H.J., Dijkstra G., Franke L., Xavier R.J., Jonkers D., Wijmenga C., Weersma R.K. and Zhernakova A. 2016. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut.* 65:740-8.

Kamada N., Seo S.U., Chen G.Y. and Núñez G. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Rev Immunol.* 13:321-335.

Karell K., Louka A.S., Moodie S.J., Ascher H., Clot F., Greco L., Ciclitira P.J., Sollid L.M., Partanen J. and the members of the European genetics cluster on celiac disease. 2003. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European genetics cluster on celiac disease. *Hum Immunol.* 64:469-477.

Kelly C.J., Zheng L., Campbell E.L., Saeedi B., Scholz C.C., Bayless A.j., Wilson K.E., Glover L.E., Kominsky D.J., Magnuson A., Weir T.L., Ehrentraut S.F., Pickel C., Kuhn K.A., Lanis J.M., Nguyen V., Taylor C.T. and Colgan S.P. 2015. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fat acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe.* 17:662-671.

Khaleghi S., Ju J.M., Lamba A. and Murray J.A. 2016. The potential utility of tight junction regulation in celiac disease: focus on larazotide acetate. *Therap Adv Gastroenterol.* 9:37-49.

Korpela K., Salonen A., Virta L.J., Kekkonen R.A., Forslund K., Bork P. and de Vos W.M. 2016. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in finish pre-school children. *Nat Commun.* 7:10410.

Lauret E. and Rodrigo L. 2013. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. *Biomed Res Int.* 127589.

Lebwohl B., Murray J.A., Verdú E.F., Crowe S.E., Dennis M. and Fasano A. 2016. Gluten introduction, breastfeeding, and celiac disease: back to the drawing board. *Am J Gastroenterol;* 111:12-14.

Leffler D.A., Green P.H. and Fasano A. 2015. Extraintestinal manifestation of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 12: 561-571.

López-Domínguez L. 2015. Disbiosis de la microbiota intestinal y cambios dietarios durante la evolución de diabetes tipo 1, en escolares sonorenses. Tesis de Maestría. CIAD. Hermosillo, Sonora.

Ludvigsson J.F., Leffler D.A., Bai J.C., Biagi F., Fasano A., Green P.H., Hadjivassiliou M., Kaukinen K., Kelly C.P., Leonard J.N., Lundin K.E., Murray J.A., Sanders D.S., Walker M.M., Zingone F. and Ciacci C. 2013. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 62:43–52.

Ludvigsson J.F. and Green P.H. 2014. The missing environmental factor in celiac disease. *N Engl J Med*. 371:1341-1343.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M. and Schleifer K.H. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*., 142:1097–1106.

Mariani P., Viti M.G., Monturi M., La Vecchia A., Cipolletta E., Calvani L. and Bonamico M. 1998. The gluten-free diet: a nutritional risk factor for a adolescents with celiac disease?. *J pediatr Gastroenterol Nutr*. 27:519-523.

Mejía-León M.E., Petrosino J.F., Ajami N.J., Domínguez-Bello M.G. and Calderón de la Barca A.M. 2014. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Sci. Report* 4:3814.

Mejía-León M.E., Ruiz-Dick K.M. and Calderón de la Barca A.M. 2015. HLA-DQ genetic risk gradient for type 1 diabetes and celiac disease in north-western Mexico. *Rev Gastroenterol Mex*. 80:135-143.

Mejía-León M.E., López-Domínguez L., Aguayo-Patrón S.V., Caire-Juvera G., Calderón de la Barca A.M. 2016. Dietary changes and gut dysbiosis in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* (submitted Nov. 2016).

McOrist A.L., Miller R.B., Bird A.R., Keogh J.B., Noakes M., Topping D.L. and Conlon M.A. 2011. Fecal butyrate levels vary widely among individuals but are usually increased by a diet high in resistant starch. *J Nutr*. 141:883-889.

Nistal E., Caminero A., Herrán A.R., Arias L., Vivas S., de Morales J.M., Calleja S., de Miera L.E., Arroyo P. and Casqueiro J. 2012a. Differences of small intestinal bacteria population in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis*. 18:649-656.

Nistal E., Caminero A., Vivas S., Ruiz de Morales J.M., Sáenz de Miera L.E., Rodríguez-Aparicio L.B. and Casqueiro J. 2012b. Differences in faecal bacteria populations and faecal metabolism in healthy adults and celiac disease patients. *Biochimie*. 94:1724-1729.

Norma Oficial Mexicana-086-SSA1-1994. Bienes y servicios. alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Secretaría de Salud. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/086ssa14.html> (fecha de consulta: 11 de Agosto del 2015).

Olaiz G., Rivera J., Shamah T., Rojas R., Villalpando S. and Hernández M. 2006 Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.

OMS. 2007. Patrones de crecimiento de la OMS. Disponible en: <http://www.who.int/childgrowth/standards/es/> (fecha de consulta: 23 de agosto del 2015).

OMS, 2015. Healthy diet. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/> (fecha de consulta: 25 de septiembre del 2015).

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

Olivares M., Albrecht S., De Palma G., Ferrer M.D., Castillejo G., Schols H.A. and Sanz Y. 2015. Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur J Nutr*. 2015. 54:119-128

Ortega M.I., Morales G.G., Quizán T. y Preciado M. 1999. Estimación del consumo de alimentos. Cálculo de la ingestión dietaria y coeficientes de adecuación a partir de registro de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos. Cuaderno de trabajo N° 1. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

Pagliari D., Cianci R., Frosali S., Landolfi R., Cammarota G., Newton E.E., and Pandolfi F. 2013. The role of IL-15 in gastrointestinal disease: a bridge between innate and adaptive immune response. *Cytokine Growth Factor Rev*. 24:455-466.

Parra-Medina R., Molano.Gonzales N., Rojas-Villarraga A., Agmon-Levin N., Arango-Levin., Arango M.T., Shoenfeld Y. and Anaya J.M. 2015. Prevalence of celiac disease in latin america: a systematic review and meta-regression. *PLoS One*. 10:e0124040.

Pellegrini N. and Agostoni C. 2015. Nutritional aspects of gluten-free products. *J Sci Food Agric*. 95:2380-2385.

Penagini F., Dilillo D., Meneghin F., Mameli C., Fabiano V. and Zuccotti C.V. 2013. Gluten-free diet in children: an approach to a nutritionally adequate and balanced diet. *Nutrients*. 5:4553-4565.

Pozo-Rubio T., de Palma G., Mujico J.R., Olivares M., Marcos A., Acuña M.D., Polanco I., Sanz Y. and Nova E. 2013. Influence of early environmental factors on lymphocyte subsets and gut microbiota in infants at risk of celiac disease; the PROFICEL study. *Nutr Hosp.* 28:464-473.

Ramírez-Cervantes K.L., Remes-Troche J.M., Del Pilar Milke-García M., Romero V. and Uscanga L.F. 2015. Characteristics and factors related to quality of life in Mexican Mestizo patients with celiac disease. *BMC Gastroenterol.* 15:4.

Radlovic N., Lekovix Z., Radlovic V., Simic D., Vuletic B., Ducic S. and Stojsic Z. 2016. Celiac crisis in children in Serbia. *Ital J Pediatr.* 42:25.

Rajilic'-Stojanovic' M. 2013. Function of the microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 27:5-16.

Remes-Troche J.M., Ramírez-Iglesias MT, Rubio-Tapia A, Alonso-Ramos A, Velazquez A. and Uscanga LF. 2006. Celiac Disease Could be a Frequent Disease in Mexico: Prevalence of Tissue Transglutaminase Antibody in Healthy Blood Donors. *J Clin Gastroenterol.* 40:697-700.

Remes-Troche J.M., Nuñez-Alvares C. and Uscanga-Dominguez L.F. 2013. Celiac disease in mexican population: An update. *Am J Gastroenterol.* 108:283-284.

Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Villalpando-Hernández S., González de Cossío T., Hernández-Prado B. and Sepúlveda J. 2001. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Instituto Nacional de Salud Pública Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Rodrigo L., Fuentes D., Riestra S., Niño P., Alvarez N., López-Vázquez A. and López-Larrea C. 2007. Increased prevalence of celiac disease in first and second-grade relatives. A report of a family with 19 studied members. *Rev Esp Enferm Dig.* 99:149-155.

Rodríguez J.M., Murphy K., Stanton C., Ross R.P., Kober O.I., Juge N., Avershina E., Rudi K., Narbad A., Jenmalm M.C., Marchesi J.R. and Collado M.C. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 26:1-17

Rojas-Martinez E. 2011. Diseño de una guía dietaria para niños entre 1 y 6 años con enfermedad celíaca. Tesis de Maestría. CIAD A.C.. Hermosillo, Sonora.

Rossi M. and Schwartz K.B. 2010. Editorial: celiac disease and intestinal bacteria: not only gluten?. *J Leuko Biol.* 87:749-751.

Rostami Nejad M., Ishaq S., Al Dulaimi D., Zali M.R. and Rostami K. 2015. The role of infectious mediators and gut micro biome in the pathogenesis of celiac disease. *Arch Iran Med.* 18:244-249.

Round J.L. and Mazmanian S.K. 2009. The gut shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 5:313-323.

Salonen A. and de Vos W.M. 2014. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu Rev Food Sci Technol.* 5:239-262.

Sánchez E., Donat E., Ribes-Koninckx C., Fernández-Murga M.L. and Sanz Y. 2013. Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Appl Environ Microbiol.* 79:5472-5479.

Sanjur D y Rodriguez M. 1997. Evaluación de la ingesta dietaria: Aspectos selectos en la colección y análisis de datos. Universidad de Cornell, New York. Pp. 59-72

Sarkhy A.A., Mouzan M.I., Saeed E., Alanazi A., Alghamdi S., Anil S. And Assiri A. 2015. Clinical characteristics of celiac disease and dietary adherence to gluten-free diet among saudi children. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 18:23-29.

See J.A., Kaukinen K., Makharia G.K., Gibson P.R. and Murray J.A. 2015. Practical insights into gluten-free diets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 12:580-591.

Sender R., Fuchs S. and Milo R. 2016. Revised for estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* 14:e1002533.

Shukla R., Ghoshal U., Dhole T.N. and Goshal U.C. 2015. Fecal microbiota in patients with irritable syndrome compared with healthy controls using real-time polymerase chain reaction: an evidence of dysbiosis. *Dig Dis Sci.* 60:2953-2962.

Singh P., Arora S., Lal S., Strand T.A. and Makharia, G.K. 2015. Risk of celiac disease in the first- and second-degree relatives of patients with celiac disease: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* 110:1539-1548.

Smith P.M., Howitt M.R., Panikov N., Michaud M., Gallini C.A., Bohlooly-Y M., Glickman J.N. and Garret W.S. 2013. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 34:569-573.

Sollid L.M., Qiao S.W., Anderson R.P., Gianfrani C. and Koning F. 2012. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics.* 64:455-460.

Sollid L.M. and Jabri B. 2013. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 13:249-302.

Sonti R., Lebwohl B., Lewis S.K., Abu Daya H., Klavan H. and Aguilar K. 2013. Men with celiac disease are shorter than their peers in the general population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*25:1033-1037.

Szajewska H., Shamir R., Mearin L., Ribes-Koninckx C., Catassi C., Domellöf M., Fewtrell M.S., Husby S., Papadopoulou A., Vandenplas Y., Castillejo G., Kolacek S., Koletzko S., Korponay-Szabó I.R., Lionetti E., Polanco I. and Troncone R. 2016. Gluten introduction and the risk of coeliac disease: a position paper by the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 62:507-513.

Tang F., Chen Z., Ciszewski C., Setty M., Solus J. and Tretiakova M. 2009. Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-5. *J Exp Med.* 206:707-719.

Tang, F., Sally, B., Lesko, K., Discepolo, V., Abadie, V., Ciszewski, C., Semrad, C., Guandalini, S., Kupfer, S.S. and Jabri, B. 2015. Cysteinyl leukotrienes mediate lymphokine killer activity induced by NKG2D and IL-15 in cytotoxic T cells during celiac disease. *J Exp Med.* 212:1487-1495.

Pilot study of montelukast in celiac disease. The University of Chicago. Disponible en: <http://www.cureceliacdisease.org/ongoing-studies/>. [29 de septiembre, 2016].

Tjellström B., Högberg L., Stenhammar L., Fälth-Magnusson K., Magnusson K.E., Norin E., Sundqvist T. and Midtvedt T. 2013. Faecal short-chain fatty acid pattern in childhood coeliac disease is normalised more than one year's gluten-free diet. *Microbial Ecol Health Dis.* 24:1-54.

Tjellström B., Stenhammar L., Sundqvist T., Fälth-Magnusson K., Hollén E., Magnusson K.E., Norin E., Midtvedt T. and Högberg L. 2014. The effects of oats on the function of gut microflora in children with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 39:1156-1160.

Troncone R. and Kosova R. 2010. Short stature and catch-up growth in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 51:137-138.

Valencia-Tapia M.Y. 2015. Desarrollo de un protocolo de tamizaje para evaluar el riesgo a enfermedad celiaca o diabetes tipo 1 en niños sonorenses. Tesis de Maestría. CIAD. Hermosillo, Sonora.

Vangay P., Ward T., Gerber J.S. and Knights D. 2015. Antibiotics, paediatric dysbiosis, and disease. *Cell Host Microbe.* 17: 553-564.

Vicentini O., Maialetti F., Gonnelli E. and Silano M. 2015. Gliadin-dependent cytokine production in a bidimensional cellular model of celiac intestinal mucosa. *Clin Exp Med.* 15:447-454.

Vogt J.A. and Wolever T.M. 2003. Fecal acetate is inversely related to acetate absorption from the human rectum and distal colon. *J Nutr.* 133:3145-3148.

Wacklin P., Laurikka P., Lindfors K., Collin P., Salmi T., Lähdeaho M.L., Saavalainen P., Mäki M., Mättö J., Kurppa K. and Kaukinen K. 2014. Altered duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms on a long-term gluten-free diet. *Am J Gastroenterol.* 109:1933–1941.

Walker W.A. 2013. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann Nutr Metab.* 63:8-15

Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K. and Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol.* 66: 297–303.

Weber T.K. and Polanco I. 2012. Gastrointestinal microbiota and some children diseases: A Review. *Gastroenterol Res Pract.* 676585.

Weiss B., Skourikhin Y., Modan-Moses D., Broide E., Fradkin A. and Bujanover Y. 2008. Is adult height of patients with celiac disease influenced by delayed diagnosis? *Am J Gastroenterol.* 103:1770-1774.

Wexler H.M. 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 20:593-621.

Wu G.D., Chen J., Hoffman C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., Sinha R., Giroy E., Gupta K., Baldassano R., Nessel L., Li H., Bushman F.D. and Lewis J.D. 2011. Linking long-term dietary with gut microbial enterotypes. *Science.* 334:105-108

Yatsunenko T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez-Bello M.G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R.N., Anokhin A.P., Heath A.C., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J.G., Lozupone C.A., Lauber C., Clemente J.C., Knights D., Knight R. and Gordon J.I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 486:222-227.