

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## ***CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA EN DEPOSICIONES DE NIÑOS CON DIARREA POR ENTEROPATÓGENOS Y SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA INTESTINAL***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***Dana Valentina Piras Jara***

**Director de Tesis: Dr. Mauricio J. Farfán**

**Santiago-CHILE**

**Enero 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**Dana Valentina Piras Jara**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis**

**Dr. Mauricio Farfán**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis**

**Dr. Sergio Álvarez**

---

**Dr. Edwar Fuentes**

---

**Dra. Caroll Beltrán**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mi mamá, la cual me ha entregado su incondicional apoyo a lo largo de la carrera, incluyendo los años de magíster.

También quisiera agradecer a mi tutor, Dr. Mauricio Farfán, por su apoyo y preocupación a la hora de efectuar la tesis.

A mis compañeros de laboratorio del Hospital Luis Calvo Mackenna, Mariana Izquierdo y Pablo Gallardo, los cuales me han ayudado y enseñado de sobremanera durante mi estadía en el laboratorio.

Finalmente quisiera agradecer a mis amigos, los cuales han estado conmigo desde el colegio y durante la universidad.

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo de investigación se financió a través de los siguientes proyectos:

Proyecto Fondecyt Regular 1200994. Proyecto ERANet17/HLH-0145 (Dr. Mauricio Farfán)

## TABLA DE CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b>	7
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	9
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	11
<b>RESUMEN</b>	12
<b>ABSTRACT</b>	14
<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. Diarrea a nivel mundial	1
1.2. <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas (ECD)	3
1.3. Mecanismo de patogenicidad de patotipos ECD	4
1.4. Microbiota intestinal	6
1.5. Metaboloma intestinal	8
1.6. Ácidos grasos de cadena corta (SCFA)	10
<b>2.PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	14
<b>3.METODOLOGÍA</b>	
3.1. Metodología del objetivo N°1	
3.1.1. Estandarizar y validar HPLC para determinar la concentración de SCFA	15
3.1.2. Determinar la concentración de ácidos grasos de cadena corta en deposiciones de niños con diarrea y sanos	18
3.2. Metodología del objetivo N°2	
3.2.1. Identificar la microbiota intestinal de deposiciones de niños con diarrea por ECD y niños	21

3.2.2. Correlación entre los niveles de SCFA encontrados con géneros de bacterias productores de SCFA en las muestras de diarrea por ECD y niños sanos	22
<b>4.RESULTADOS</b>	
4.1. Resultados del Objetivo N°1	
4.1.1. Estandarización y validación del método HPLC	23
4.1.2. Cuantificación de acetato, propionato y butirato en muestras de deposición de niños con diarrea y sin diarrea por ECD	25
4.2. Resultados del Objetivo N°2	
4.2.1. Identificación de la microbiota intestinal en niños con diarrea por ECD y niños sanos	30
4.2.2. Determinación de los microorganismos productores de SCFA	32
4.2.3. Correlación entre niveles de SCFA y microorganismos productores de SCFA	35
<b>5.DISCUSIÓN</b>	37
<b>6.CONCLUSIONES</b>	51
<b>7.BIBLIOGRAFÍA</b>	52
<b>8.ANEXO 1</b>	60

## ABREVIATURAS

OMS	: Organización mundial de la salud
ECD	: <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas
EPEC	: <i>E. coli</i> enteropatógena
STEC	: <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
ETEC	: <i>E. coli</i> enterotoxigénica
EAEC	: <i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	: <i>E. coli</i> enteroinvasiva
DAEC	: <i>E. coli</i> de adherencia difusa
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase chain reaction</i> )
GEMS	: Estudio multicéntrico entérico global (del inglés <i>Global Enteric Multicenter Study</i> )
LEE	: Locus de Borrado del Enterocito (del inglés <i>Locus of enterocyte effacement</i> )
Tir	: Receptor de Intimin translocado (del inglés <i>Translocated Intimin Receptor</i> )
T3SS	: Sistema de secreción tipo 3 (del inglés <i>Type 3 secretion system</i> )
Stx	: Toxina shiga (del inglés <i>Shiga toxins</i> )
SUH	: Síndrome urémico hemolítico
ST	: Enterotoxina termoestable
LT	: Enterotoxina termolábil
DAF	: Factor de aceleración de la descomposición (del inglés <i>Decay-accelerating factor</i> )
CAECAM	: Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (del inglés <i>Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule</i> )
CFs	: Factor de colonización (del inglés <i>colonization factors</i> )
IL-8	: Interleuquina 8

NF-Kb	: Factor nuclear kappaB (del inglés <i>Nuclear factor kappa B</i> )
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés <i>Mitogen-activated protein kinases</i> )
LC-MS	: Cromatografía líquida-espectrometría de masas
HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>High-performance liquid chromatography</i> )
SCFA	: Ácido graso de cadena corta (del inglés <i>short chain fatty acids</i> )
RSD	: Desviación estándar relativa
FA	: Filmarray®
CB	: Cary Blair
16S rRNA	: ARN ribosomal 16S
ASV	: <i>Amplicon sequence variant</i>
OPUs	: Unidades filogenéticas operativas (del inglés <i>Operational Phylogenetic Units</i> )
OTUs	: Unidades taxonómicas operativas (del inglés <i>Operational Taxonomic Units</i> )
APLV	: Alergia proteína de Leche de Vaca
AAM	: Alergia Alimentaria Múltiple
SII	: Síndrome del intestino irritable
PEDV	: Virus de la diarrea epidémica porcina (del inglés <i>Porcine epidemic diarrhea virus</i> )
SPI-1	: Isla de patogenicidad 1 de <i>Salmonella</i> (del inglés <i>Salmonella pathogenicity island 1</i> )
GPCR	: Receptor acoplado a proteína G (del inglés <i>G protein-coupled receptors</i> )
HDAC	: Histona deacetilasa (del inglés <i>Histone deacetylases</i> )

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estructura de las comunidades microbianas de heces de niños positivos para virus, para ECD y sanos	7
<b>Figura 2</b>	Estructura metabolómica de muestras de heces sanas y positivas para ECD	9
<b>Figura 3</b>	Concentración de SCFA en deposiciones de niños sanos y con diarrea	13
<b>Figura 4</b>	Cromatograma de estándares de SCFA a una concentración de 25 mM	23
<b>Figura 5</b>	Cromatograma de estándares de SCFA en medio CB a una concentración de 25 mM	27
<b>Figura 6</b>	Concentración de SCFA en deposiciones de niños con diarrea y sanos	28
<b>Figura 7</b>	Concentraciones de SCFA por patotipos ECD en niños con diarrea	29
<b>Figura 8</b>	Composición de la microbiota a nivel de filo en niños con diarrea por ECD y niños sanos	31
<b>Figura 9</b>	Composición de la microbiota a nivel de familia en niños con diarrea por ECD y niños sanos	31
<b>Figura 10</b>	RDA de deposiciones de niños con diarrea por ECD y niños sanos	32
<b>Figura 11</b>	Abundancia relativa de los géneros de bacterias productoras de SCFA aumentados en ECD versus control	33

<b>Figura 12</b>	Abundancia relativa de los géneros de bacterias productoras de SCFA disminuidos en ECD versus control	34
<b>Figura 13</b>	Correlación entre los niveles de SCFA con microorganismos productores de SCFA en niños con diarrea y sanos	36

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Parámetros de validación del método de HPLC para los 3 SCFA evaluados	24
<b>Tabla 2</b>	Edad media y patógenos de las muestras del grupo control y diarrea	25
<b>Tabla 3</b>	Características de las 30 muestras de deposición de niños sanos sin diarrea	26
<b>Tabla 4</b>	Condiciones del sistema en gradiente empleado en la cuantificación de SCFA	26
<b>Tabla 5</b>	Verificación del método HPLC para los 3 SCFA evaluados	26

## RESUMEN

La diarrea es un grave problema de salud pública mundial, y una causa importante de morbilidad y mortalidad en niños menores de 5 años. La diarrea de origen bacteriano cobra gran importancia en países en desarrollo, siendo las cepas *Escherichia coli* diarreogénicas (ECD) la causa bacteriana más común de diarrea en dichos países. La capacidad de las cepas ECD para colonizar el epitelio intestinal depende de la expresión de factores de virulencia en el sitio de infección, el cual es un proceso altamente regulado y relacionado con la interacción del patógeno con el ambiente intestinal del hospedero. La microbiota intestinal y los metabolitos producidos en ella cumplen roles fundamentales para mantener la salud del hospedero. En este sentido, los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) han tenido un papel clave en el desarrollo de la enfermedad diarreica, ya que distintas investigaciones le han otorgado un rol dual a los SCFA, ya sea protectores para el desarrollo de la diarrea como moléculas de señalización para el proceso infeccioso de los enteropatógenos. Los datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio han identificado una microbiota y un metaboloma distintivo en deposiciones de niños con diarrea positivos para ECD a comparación de niños sanos. Además, se evidenciaron niveles de acetato, propionato y butirato aumentados en los niños con diarrea. Considerando estos antecedentes, se postuló la siguiente hipótesis: “Los niveles de SCFA en deposiciones de niños con diarrea por ECD están significativamente aumentados en comparación de niños sanos, asociándose a una microbiota intestinal productora de estas moléculas”. Para responder esta hipótesis, en primera instancia, se determinó la concentración de acetato, propionato y butirato en deposiciones de niños con diarrea por ECD y niños sanos. Para esto, se cuantificaron los niveles de SCFA mediante HPLC, método que tuvo que ser estandarizado y validado previamente en nuestro laboratorio, teniendo que cumplir con los criterios de aceptación requeridos en el manual de ISP. Este análisis mostró que existen concentraciones

más altas de acetato, propionato y butirato en las deposiciones de niños con diarrea por ECD en comparación con niños sanos. En segundo lugar, se correlacionaron los niveles de SCFA encontrados con una microbiota productora de estas moléculas en niños con diarrea por ECD y niños sanos. Para esto, se extrajo el ADN de las muestras de deposición de niños pertenecientes a estos dos grupos y luego amplificar y secuenciar el gen que codifica el ARN ribosomal 16S. Con estas secuencias, se realizó un estudio bioinformático que permitió caracterizar la microbiota asociada a cada grupo. En este análisis, se confirmó que en el grupo ECD existe una microbiota distintiva a comparación del grupo sano, además de mayores niveles de abundancia relativa de los géneros de bacterias productoras de SCFA *Veillonella* y *Streptococcus* en los niños con diarrea por ECD a comparación del grupo sano. Adicionalmente, un análisis de correlación mostró que la producción de acetato se correlaciona positivamente con el género *Blautia*, mientras que la producción de propionato y butirato se correlaciona positivamente con el género *Coprococcus* en los niños con diarrea por ECD. La producción de butirato se correlacionó positivamente con los géneros *Faecalibacterium* y *Roseburia* tanto en el grupo ECD como en el grupo control, y el género *Bacteroides* fue el único que se correlacionó negativamente en la producción de acetato y propionato en el grupo control. En conjunto nuestros resultados indican que el aumento en los niveles de SCFA encontrados se correlacionan con la presencia de géneros específicos de bacterias productoras de SCFA, pero no con el aumento o disminución en la abundancia relativa de estos géneros tanto en niños con diarrea por ECD como niños sanos.

## **ABSTRACT**

Diarrhea is a serious global public health problem, and a major cause of morbidity and mortality in children under 5 years of age. Bacterial diarrhea is of great importance in developing countries, with Diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) strains being the most common bacterial cause of diarrhea in these countries. The ability of DEC strains to colonize the intestinal epithelium depends on the expression of virulence factors at the site of infection, which is a highly regulated process related to the interaction of the pathogen with the intestinal environment of the host. The intestinal microbiota and the metabolites produced in it play fundamental roles in maintaining the health of the host. In this sense, short-chain fatty acids (SCFA) have played a key role in the development of diarrheal disease, since different investigations have given a dual role to SCFA, either protective for the development of diarrhea and signaling molecules for the infectious process of enteropathogens. Preliminary data obtained in our laboratory have identified a distinctive microbiota and metabolome in stools of children with DEC-positive diarrhea compared to healthy children. In addition, increased acetate, propionate, and butyrate levels were found in children with diarrhea. Considering this background, the following hypothesis was postulated: "SCFA levels in stools of children with DEC diarrhea are significantly increased compared to healthy children, being associated with an intestinal microbiota that produces these molecules." To answer this hypothesis, in the first instance, the concentration of acetate, propionate and butyrate in stools of children with diarrhea due to DEC and healthy children was determined. For this, SCFA levels were quantified by HPLC, a method that had to be previously standardized and validated in our laboratory, having to meet the acceptance criteria required in the ISP manual. This analysis showed that there are higher concentrations of acetate, propionate, and butyrate in the stools of children with DEC diarrhea compared to healthy children. Second, SCFA levels found were correlated with a microbiota that produced these

molecules in children with DEC diarrhea and healthy children. For this, the DNA of the stool samples of children belonging to these two groups was extracted and then the gene encoding the 16S ribosomal RNA was amplified and sequenced. With these sequences, a bioinformatic study was carried out that made it possible to characterize the microbiota associated with each group. In this analysis, it was confirmed that in the DEC group there is a distinctive microbiota compared to the healthy group, in addition to higher levels of relative abundance of the genera of SCFA-producing bacteria *Veillonella* and *Streptococcus* in children with DEC diarrhea compared to the group healthy. Additionally, a correlation analysis showed that acetate production was positively correlated with the genus *Blautia*, while propionate and butyrate production was positively correlated with the genus *Coprococcus* in children with DEC diarrhea. The production of butyrate was positively correlated with the genera *Faecalibacterium* and *Roseburia* in both the DEC group and the control group, and the genus *Bacteroides* was the only one that was negatively correlated in the production of acetate and propionate in the control group. Taken together, our results indicate that the increase in the levels of SCFA found correlate with the presence of specific genera of SCFA-producing bacteria, but not with the increase or decrease in the relative abundance of these genera, both in children with diarrhea due to DEC and healthy childre

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Diarrea a nivel mundial

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la diarrea como tres o más deposiciones acuosas por día, a menudo acompañada de una molestia abdominal y alteraciones en las características de las heces (Baldi, 2009). La mayoría de los pacientes consideran que la mayor liquidez de las heces es la principal característica de la diarrea, no obstante, debido a que esta característica es difícil de cuantificar, generalmente los investigadores utilizan la frecuencia y/o el peso de las heces como marcadores distintivos de la diarrea (Schiller, 2000). La duración de la diarrea es un factor clave para evaluar el origen de la condición, los pacientes que presentan diarrea aguda (<14 días de duración) son más propensos a tener una causa infecciosa. En contraste, pacientes con diarrea crónica/persistente (más allá de 14 días) tienen un espectro de causas más amplio, que no sólo incluye problemas infecciosos, sino una variedad de otras afecciones como: síndrome de malabsorción, enfermedades intestinales inflamatorias (colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn), abuso de fármacos o laxantes, entre otras causas (Schiller, 2000). La diarrea infecciosa es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial en niños y pequeños infantes, afectando principalmente a la población pediátrica menor de 5 años. En 2015, los niños menores de cinco años tuvieron un promedio de 1,4 episodios de diarrea cada año, lo que condujo a un estimado de 499.000 muertes, convirtiendo la diarrea como la segunda causa más común de muerte en niños menores de 5 años (Wang y cols., 2016). Múltiples factores se han asociados a un mayor riesgo de padecer enfermedades diarreicas, como, por ejemplo: falta de acceso a agua potable; eliminación inadecuada de desechos humanos; hacinamiento y exposición a animales de granja; estándares más bajos en el manejo de alimentos e higiene; disminución en la accesibilidad de atención médica y bajo nivel educativo (O’Ryan y cols., 2005). Como resultado, la mayor incidencia de enfermedades diarreicas ocurre en países de bajos y medianos

ingresos, los cuales carecen de las medidas preventivas sanitarias básicas y falta de acceso a una adecuada atención médica. La OMS estima que en 2015 más del 98% de las muertes por diarrea ocurrieron en países de bajo o mediano ingreso (Wang y cols., 2016). De hecho, las muertes asociadas a diarrea ocurren casi exclusivamente en dichos sectores.

La etiología de la diarrea infecciosa varía globalmente y es causada por una gran variedad de patógenos virales (rotavirus, norovirus, astrovirus, adenovirus), bacterianos (*Escherichia coli* diarreogénicas, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*) y parásitos (*Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*), que al interrumpir las funciones normales de secreción y absorción del intestino, causan una rápida pérdida de fluidos corporales y nutrientes, provocando deshidratación, desnutrición y muerte si no es tratada de forma adecuada (Selendy, 2019). Entre los años 2015 y 2019 se realizó un estudio de vigilancia para determinar la presencia de patógenos entéricos en niños menores de 5 años hospitalizados por diarrea aguda en uno de los centros centinelas de vigilancia de rotavirus en Chile. Evidenciando que el 70% de los episodios de diarrea aguda fueron causados por virus gastroentéricos, mientras que se pudo identificar enteropatógenos bacterianos en 57% de las infecciones intestinales y los protozoos parasitarios se detectaron en 4% de los casos. De los agentes virales, el rotavirus fue el virus más detectado y uno de los patógenos más prevalentes en dos grupos de edad, lactantes bajo un año y niños de 1 a 4 años. Los agentes bacterianos más frecuentes fueron EPEC (27%), *Clostridium difficile* (17%), EAEC (14%) y *Campylobacter* (9%). Respecto a los parásitos, se identificó *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium*, en el 3 y 1% del total de las muestras, respectivamente (Poulain y cols., 2021). Como se puede evidenciar, las cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas (ECD) tienen la mayor incidencia dentro de las causas bacterianas, y a diferencia de los virus, tienen una mayor asociación con malas condiciones sanitarias (O’Ryan y cols., 2005)

## 1.2 *Escherichia coli* diarreogénicas (ECD)

Las cepas de ECD proceden del ancestro en común *Escherichia coli* (*E.coli*), y son la causa bacteriana más común de diarrea en los países en desarrollo, causando aproximadamente el 30 al 40 % de los episodios de diarrea aguda en niños y afectando principalmente a la población pediátrica menor de 5 años en países de África subsahariana y de Asia meridional, provocando una alta mortalidad en dichos sectores (O’Ryan y cols., 2005; UNICEF, 2013). De acuerdo con los síntomas clínicos y detección de factores de virulencia, las cepas de ECD se clasifican en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Debido a que las técnicas de cultivo tradicionales para aislar las cepas de *E. coli* patógenas pueden llevar mucho tiempo y ser laboriosas, la adopción de técnicas moleculares, como reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple), ha permitido una detección e identificación más rápida de los diferentes patotipos (Croxen y cols, 2013).

Los datos del *Global Enteric Multi-Center Study* (GEMS), uno de los centros de estudios más grandes que se enfoca en comprender la importancia de las enfermedades diarreicas pediátricas en África subsahariana y el sur de Asia, indicó que el patotipo *E. coli* enterotoxigénica se encuentra entre los cuatro principales agentes causantes de diarrea moderada a severa entre los niños de las áreas mencionadas (Kotloff y cols, 2013). Adicionalmente, en un estudio reciente que incluyó participantes con diarrea leve a moderada, lo que expande notablemente los resultados clínicos adversos de la enfermedad diarreica, evidenció nuevamente que ETEC se encuentra entre las 4 principales causas de diarrea en niños <5 años (Kotloff y cols, 2019). En el caso de Chile, en un estudio realizado en el Hospital Luis Calvo Mackenna se encontró una prevalencia del 49% de causas bacterianas en las infecciones diarreicas, correspondiendo el 66% a ECD, siendo los patotipos EAEC y EPEC los más comunes detectados (Farfán y cols, 2016). Estos antecedentes en conjunto recalcan el papel de los patotipos ECD en la carga

sanitaria global de las enfermedades diarreicas, por lo que entender las bases moleculares de la patogénesis y diseñar nuevas estrategias destinadas a controlar estas infecciones a nivel mundial, podrían reducir sustancialmente la carga de las enfermedades diarreicas y el colapso nutricional asociado.

### **1.3 Mecanismo de patogenicidad de patotipos ECD**

En general, todos los patotipos ECD comparten las mismas etapas para colonizar la superficie del intestino, que consisten en 3 pasos: (i) adherencia y colonización del epitelio intestinal, (ii) producción y secreción de factores de virulencia y (iii) diarrea e inflamación (Croxen y cols., 2013). Sin embargo, cada patotipo posee su propio mecanismo de patogenicidad para inducir la enfermedad diarreica, lo cual depende principalmente de la diferente combinación de factores de virulencia adquiridos.

Los patotipos EPEC y STEC comparten una isla de patogenicidad llamada LEE (*locus of enterocyte effacement*), que causa una lesión histopatológica típica llamada lesión A/E (adherencia/eliminación) en la superficie del epitelio intestinal del hospedero. Esta lesión se caracteriza por la eliminación de microvellosidades de la célula epitelial, lo que permite la adherencia íntima de la bacteria a la membrana apical de la célula y la formación de un pedestal de actina por debajo de la unión bacteriana. Estos pedestales se producen por la inyección del receptor Tir (*Translocated Intimin Receptor*) en el citosol de la célula hospedero a través de un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS), siendo ambos codificados en LEE, generando la reorganización del citoesqueleto y finalmente alterando la morfología y función de las microvellosidades intestinales (Vidal y cols., 2007; Farfán y Torres, 2012). No obstante, EPEC y STEC contienen diferentes conjuntos de genes que los hacen diferentes. STEC ha sido una de las principales causas de diarrea sanguinolenta y colitis hemorrágica a nivel mundial, caracterizándose principalmente por la producción de la toxina shiga (Stx). Esta toxina causa un gran daño a la microvasculatura del colon, y está asociada principalmente a complicaciones extraintestinales que conlleva la infección por STEC, puesto que favorece el desarrollo del síndrome urémico hemolítico (SUH), el cual es una

afección potencialmente mortal que involucra trombocitopenia, anemia hemolítica y falla renal aguda (Sandvig, 2001).

ETEC y EAEC causan diarrea a través de un desequilibrio electrolítico mediado por exotoxinas. Ambos interrumpen la homeostasis celular por factores de virulencia secretados que actúan a distancia, siendo sus mecanismos de adherencia fundamentales para que actúen estos factores de virulencia. ETEC causa enfermedad al colonizar el intestino delgado a través de su unión al revestimiento epitelial del hospedero por proteínas superficiales llamadas CFs (*colonization factors*), y una vez adherido produce varias enterotoxinas, incluyendo enterotoxina termoestable (ST) y enterotoxina termolábil (LT), las cuales causan las manifestaciones clínicas típicas de la diarrea inducida por ETEC. EAEC por su parte basa su patogénesis al adherirse a la mucosa intestinal de forma autoagregativa por la interacción de adhesinas con receptores de la superficie epitelial. Luego de la colonización, comienza la secreción de diversas toxinas que afectan la morfología celular y causan un gran daño a la mucosa intestinal, induciendo una diarrea acuosa y persistente (Croxen y cols., 2013).

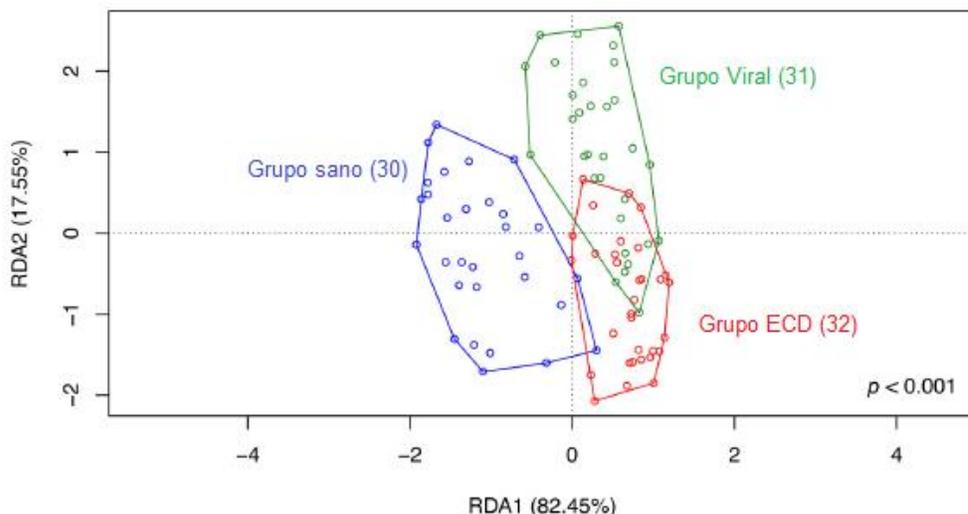
En el caso de EIEC, comparte varias propiedades bioquímicas, genéticas y patogénicas con *Shigella*. La infección por EIEC se basa en la penetración del epitelio intestinal a través de las células M y así acceder a la submucosa. EIEC evade el sistema inmune submucoso al inducir la muerte celular de macrófago seguido de una invasión basolateral de colonocitos y diseminación lateral (Ud-Din y Wahid, 2014). Finalmente DAEC, la cual a diferencia de las otras cepas ECD no consiste en los típicos patrones de adherencia, basa su mecanismo patogénico en la expresión de adhesinas, que al unirse a distintos receptores, como DAF (*decay-accelerating factor*) o CAECAM (*carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule*), en la superficie apical de las células epiteliales induce el reordenamiento del citoesqueleto y promueve la fijación estrecha de la bacteria, lo que destruye o reorganiza parcialmente las microvellosidades (Le Bouguéneq y Servin, 2006).

Es claro que cada patotipo posee su propio mecanismo de patogenicidad para inducir la enfermedad diarreica. Sin embargo, la mayoría de ECD coinciden en la respuesta proinflamatoria que generan sobre células epiteliales intestinales, la cual se caracteriza por la producción de interleuquina 8 (IL-8) (Zhou y cols., 2003; Harrington y cols., 2005; Khan y cols., 2004; Betis y cols., 2003b). La capacidad de inducir una inflamación severa es consecuencia directa de la liberación de citoquinas, quimioquinas y el reclutamiento de células inflamatorias, lo cual es producido cuando los patotipos ECD estimulan la respuesta inflamatoria en la mucosa gastrointestinal al activar las vías de señalización intracelular del factor nuclear kappaB (NF-Kb) y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), lo que desencadena la expresión y secreción de marcadores proinflamatorios como IL-8, la cual es la molécula efectora prototípica para este proceso (Sanchez-Villamil y Navarro-Garcia, 2015). A pesar de que se conoce en gran medida cómo se induce la respuesta inflamatoria, la información es limitada en cuanto a los factores que podrían modular la expresión de los genes de virulencia vinculados con la inflamación.

#### **1.4 Microbiota intestinal**

La expresión de genes de virulencia es un proceso altamente regulado, ya sea por condiciones ambientales y/o reguladores bacterianos. Sin embargo, los factores ambientales involucrados en la regulación de virulencia han sido poco estudiados, ya que la mayoría de las investigaciones se centran en el mecanismo molecular de la bacteria (Kitamoto y cols., 2016). Varios estudios han demostrado que la composición de la microbiota está directamente relacionada con el desarrollo de enfermedades diarreicas (Nelson y cols., 2012; Lindsay y cols., 2015). Un análisis de 200 comunidades intestinales de pacientes con diarrea y 75 de individuos sanos, reveló que la microbiota intestinal de los pacientes con diarrea presentaban un mayor número de bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria en vez de Bacteroidetes y Firmicutes (Singh y cols., 2015). Estos últimos son los comensales más comunes y predominantes del intestino humano, mientras que el filo Proteobacteria incluye una gran variedad de patógenos, como *E. coli* (Power y cols.,

2014). Además, los individuos que presentaban una población de microbiota similar y menos diversa desarrollaron una infección entérica aguda y tenían mayores probabilidades de tener resultados graves de la enfermedad. Por lo que, se sugirió que los aumentos en poblaciones específicas de microbios, principalmente atribuidas a *Escherichia*, ocurren durante una infección entérica (Singh y cols., 2015). Estos hallazgos concuerdan con un estudio realizado por nuestro laboratorio en 2017, en el cual se estudió la composición de la microbiota en muestras de deposición de niños chilenos menores de 5 años clasificados en 3 grupos de estudio: infecciones diarreicas positivas para patógenos virales, positivas para algún patotipo de ECD y niños sanos sin diarrea. A partir de un análisis de redundancia (RDA), ensayo que permite distribuir las muestras en función de la similitud en la composición de su microbiota, se determinó que las muestras se agrupan en *cluster* característicos dependiendo del grupo que pertenecen, por lo que se concluyó que existe una microbiota intestinal distintiva en las infecciones ECD (Fig.1). Esta microbiota se caracterizó por presentar mayor frecuencia de Proteobacteria, junto con una menor proporción de Firmicutes a comparación de los individuos sanos (Gallardo y cols., 2017).



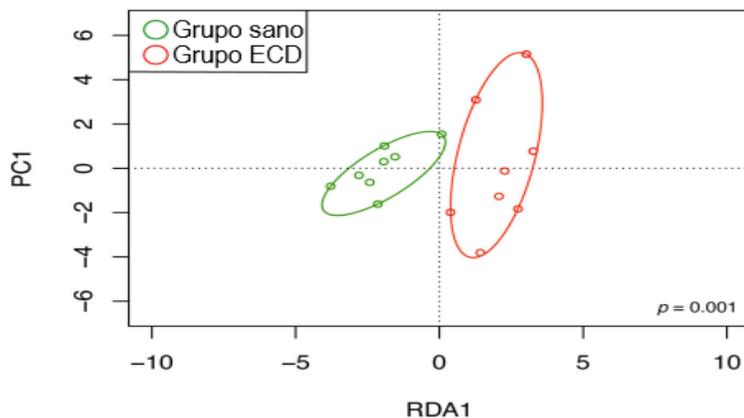
**Figura 1. Estructura de las comunidades microbianas en muestras de deposición de niños positivos para virus, para ECD y sanos.** Análisis de RDA que permiten observar la distribución de las comunidades microbianas y su organización de acuerdo al grupo al que pertenecen. Los círculos verdes, rojos y azules representan las muestras de deposición positivas para virus, positivas para ECD y sanas, respectivamente. El análisis estadístico de la agrupación de las muestras se determinó mediante ANOVA utilizando el programa estadístico *R Studio*.

Entender cómo las comunidades microbianas intestinales cambian durante una infección entérica e identificar los factores que provocan estos cambios, son importantes para dilucidar cómo los enteropatógenos regulan sus factores de virulencia. Existen diversos estudios que han propuesto que la microbiota intestinal desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión de los factores de virulencia por parte de los enteropatógenos. Un ejemplo de aquello es un componente predominante de la microbiota, *Bacteroides thetaiotaomicron* (*B. thetaiotaomicron*), el cual reside en los sitios de unión de STEC y aumenta la expresión de los genes de virulencia de STEC. Esto ocurre debido a que *B. thetaiotaomicron* dentro del intestino es capaz de degradar los polisacáridos complejos en monosacáridos, los cuales son fácilmente detectados y utilizados por especies bacterianas no glucogénicas como STEC. Por lo tanto, *B. thetaiotaomicron* al modificar los metabolitos en el ambiente del sitio de infección modula la expresión de los genes de virulencia de STEC, generando mayor virulencia que es acompañada de una mayor formación de lesiones A/E (Curtis y cols., 2014). Además, se ha demostrado que la producción del metabolito hidrógeno por parte de habitantes comunes del intestino es utilizado como combustible energético por muchas bacterias patógenas que codifican hidrogenasas en sus membranas, incluyendo STEC, *Shigella* y *Campylobacter jejuni* (Maier, 2003). Aquello se evidenció en un estudio realizado en 2013, donde se reportó la importancia del hidrógeno como fuente de energía en la capacidad de *Salmonella Typhimurium* para establecer infección, puesto que ratones mutantes para el gen de hidrogenasa fracasaban en colonizar el intestino de ratones, indicando que la utilización de hidrógeno molecular podría ser una estrategia fundamental para aumentar las reservas energéticas durante la invasión inicial del ecosistema intestinal (Maier y cols., 2013).

### **1.5 Metaboloma intestinal**

La microbiota intestinal es una comunidad bacteriana compleja, pero es relativamente estable en el tiempo, por lo que la alteración o interrupción de la microbiota (disbiosis) generalmente se vincula con la patogénesis de muchas

enfermedades e infecciones gastrointestinales (Li y cols., 2021). Esta microbiota genera un metaboloma intestinal que comprende todos los metabolitos presentes en el intestino, producidos por la interacción entre el hospedero, la misma microbiota, la dieta y los medicamentos ingeridos. Entre las múltiples formas en que la microbiota afecta al metaboloma, se incluye secreción de metabolitos bacterianos, la producción de enzimas que modifican los metabolitos y alteran el metabolismo del hospedero. Estos mecanismos en conjunto generan que los metabolitos cumplan un factor clave para la mantención de una homeostasis en la microbiota intestinal (Beebe y cols., 2014). Teniendo en cuenta la disbiosis presente en las infecciones diarreicas, se llevó a plantear que los metabolitos producidos en la microbiota también deberían estar cambiando en las infecciones positivas para ECD. Para dilucidar aquello, en un estudio reciente de nuestro laboratorio se evaluó la composición del metaboloma en muestras de deposición de niños sanos y niños con diarrea positivos para patotipos de ECD. La composición del metaboloma se analizó por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), donde se seleccionaron 88 metabolitos de origen bacteriano para comparar ambos grupos de estudio. Mediante un análisis de RDA, se encontró que existe una composición metabólica distintiva para el grupo de niños con diarrea por ECD en comparación a niños sanos (Fig.2) (Gallardo y cols.,2020).



**Figura 2. Estructura metabólica de muestras de deposición sanas y positivas para ECD.** La estructura metabólica de cada muestra y su organización según el grupo de muestra se analizó mediante RDA. Los círculos verdes y rojos representan la composición del metaboloma que se encuentra en muestras de deposición sanas y positivas para ECD, respectivamente. El análisis se realizó utilizando las intensidades máximas de 88 metabolitos detectados por LC-MS. La diferencia significativa se analizó mediante ANOVA, utilizando el paquete vegano para R.

Hoy en día se sabe que diversos metabolitos producidos por la microbiota intestinal en el tracto intestinal modulan las interacciones entre la microbiota intestinal y patógenos entéricos, como ECD. Entre ellos se destacan los ácidos grasos de cadena corta (SCFA por sus siglas en inglés *short chain fatty acids*), succinato, mucina, hidrógeno, ácidos biliares y autoinductores (Vogt y cols., 2015). Dada su abundancia en el medio intestinal, los ácidos grasos de cadena corta se han estudiado ampliamente como moléculas de señalización para el proceso infeccioso de enteropatógenos. De hecho, varios enteropatógenos, como *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y patotipos ECD, tienen la capacidad de detectar y responder a los niveles de SCFA (Sun y O’Riordan, 2013).

## **1.6 Ácidos grasos de cadena corta (SCFA)**

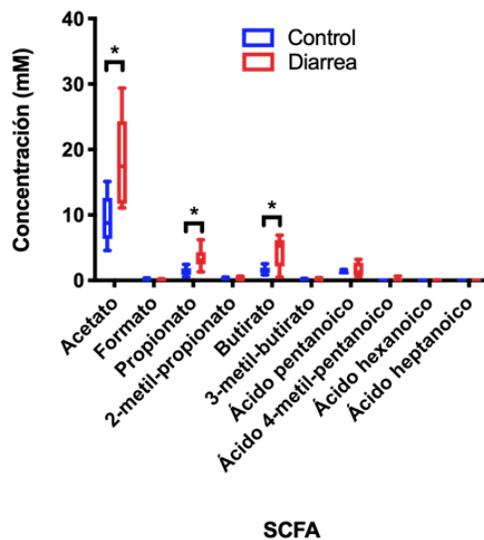
Los SCFA son producto de la fermentación de la fibra dietética por numerosas especies bacterianas del tracto gastrointestinal. Están compuestos por 2 a 6 átomos de carbono en longitud, y los más importantes a nivel intestinal son el ácido acético, propiónico y butírico. En el lumen del colon la proporción de la producción de acetato, propionato y butirato es de 60:20:20, y generalmente la relación permanece constante, no obstante, se puede producir alteraciones en la producción y absorción debido a cambios en la dieta (Xu y cols., 2020). Los SCFA son aprovechados por el epitelio intestinal principalmente como sustrato energético para mantener su integridad y función, destacando en este sentido el ácido butírico, ya que es el principal metabolito energético utilizado por los colonocitos. El sitio principal de fermentación ocurre en el ciego y el colon proximal, donde se estima una cantidad de SCFA que varía entre 70 a 140 mM, mientras que en el colon distal la concentración va decreciendo hasta alcanzar 20 a 70 mM. Los SCFA no solamente cumplen un papel como nutriente en el epitelio del colon, sino que también como moduladores del pH colónico e intracelular, del volumen celular, transporte de iones y otras funciones asociadas a regular la proliferación, diferenciación y expresión génica. Un aumento en la producción de SCFA da como resultado una disminución del pH, lo que afecta directamente a la composición de la microbiota del colon. De

hecho, la actividad y composición de la microbiota intestinal está altamente influenciada por estos sustratos derivados de la dieta (Wong y cols., 2006). Varios estudios han demostrado que las concentraciones totales y las diferencias regionales de SCFA están implicadas en diversas patologías del colon, como cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y enfermedades crónicas, como asma, obesidad, diabetes, hipertensión y la enfermedad cardiometabólica (Berthon y cols., 2013; La Cuesta-Zuluaga y cols., 2019; Makki y cols., 2018). Sin embargo, la evidencia recolectada hasta ahora es controversial, ya que algunas investigaciones indican que los SCFA podrían cumplir un efecto tanto beneficioso como inhibitorio para la colonización de patógenos dependiendo de la concentración y el pH ambiental. Las altas concentraciones de SCFA y bajo pH se han vinculado con efectos antibacterianos, ya que la forma no ionizada es capaz de difundir libremente a través de las membranas bacterianas, y una vez adentro se disocian generando la acumulación de protones y formas aniónicas de SCFA. La acumulación de protones acidifica el compartimiento celular y disipa la fuerza motriz de los protones, lo que compromete las reacciones metabólicas y la conservación de energía. Por otro lado, la acumulación de aniones SCFA significativamente afecta el balance osmótico de la bacteria (Sun y O'Riordan, 2013). Mientras que, a concentraciones más bajas los SCFA pueden representar una señal útil para la regulación de los genes de virulencia, permitiendo que los patógenos determinen su posición dentro del tracto gastrointestinal (Vogt y cols., 2015). Por ejemplo, en presencia de bajas concentraciones de butirato se aumenta la actividad promotora del operón LEE1 de STEC, el cual codifica el regulador global de los genes LEE (Ler). Esto ocurre a través de la proteína reguladora sensible a leucina (Lrp), la cual al responder a butirato activa reguladores responsables de aumentar la expresión del gen que codifica Ler (Nakanishi y cols., 2009; Takao y cols., 2014). Además de los genes de virulencia, se ha visto que el butirato también estimula la producción de flagelos y mejora la motilidad bacteriana (Tobe y cols., 2011).

Para descifrar la importancia de la microbiota intestinal y así de los metabolitos contenidos en ella, como los SCFA, en la regulación de los factores de virulencia de los enteropatógenos, se comenzó a evaluar el rol de la microbiota intestinal de niños chilenos con diarrea positiva para patotipos ECD en la virulencia de 2 patotipos de ECD, STEC y EAEC. En el estudio realizado por nuestro grupo en el año 2017 se logró la identificación de 4 especies indicadoras para el grupo ECD, correspondiente a *Escherichia albertii*, *Citrobacter werkmanii*, *Yersinia enterocolítica* y *Haemophilus sputorum* (Gallardo y cols., 2017). En este caso, una especie indicadora nos señala que la bacteria está significativamente presente en los niños con diarrea positivos para ECD a comparación de niños sanos. Luego, para comprender el papel de las especies indicadoras en la patogenicidad de los patotipos EAEC y STEC, se seleccionó aquella con mayor significancia estadística, la cual correspondía a *Escherichia alberti* (*E. alberti*). En estos ensayos, se realizó incubación conjunta del sobrenadante de cultivos de *E. alberti* con STEC y EAEC. Luego, las células intestinales se infectaron con estos patotipos, lo que generó cambios en la expresión de los genes de virulencia de STEC y EAEC, y un aumento significativo en la secreción de IL-8 en las células intestinales (datos no publicados). De esta forma, se demuestra que metabolitos secretados por una bacteria de la microbiota asociada a una infección por ECD cumplen un papel clave en la expresión de factores de virulencia y en la inducción de la secreción de IL-8. Al evaluar el sobrenadante de *E. alberti* se detectó la presencia de acetato (3,6 mM) y formato (2,7 mM). Para evaluar el papel que juegan los SCFA sobre la inducción de IL-8, los patotipos EAEC y STEC se incubaron con acetato a la concentración encontrada en el íleon humano (25 mM) y el colon (100 mM). Posteriormente, se infectaron células intestinales con estos patotipos, observándose una mayor secreción de IL-8 por las células en cultivo (datos no publicados). Esto indica que los SCFA podrían desempeñar un rol crucial en la inducción de la respuesta inflamatoria por parte de ECD en las células intestinales, lo que a su vez podría atribuirse a la regulación positiva de los genes de virulencia. A partir de estos resultados, se procedió a determinar, de manera preliminar, los niveles de SCFA en 16 muestras de deposiciones de niños menores de 5 años, 8 muestras positivas para patotipos ECD

y 8 muestras de niños sanos sin diarrea, revelando un nivel significativamente más alto de acetato, propionato, y butirato en las muestras de diarrea (Fig.3).

En conjunto, estos antecedentes sugieren que en los episodios de diarrea causados por ECD se producen cambios en la comunidad de bacterias productoras de SCFA, lo que a su vez aumenta las concentraciones de SCFA en el epitelio intestinal, y se modula la expresión de los factores de virulencia de estos patógenos. De acuerdo a lo anterior, es necesario identificar si existe efectivamente mayores niveles de SCFA en muestras de diarrea de niños con infecciones ECD a comparación de niños sanos, ya que en un futuro cercano los SCFA podrían actuar como indicadores de una infección ECD, y así favorecer al diagnóstico y relacionarlos con la gravedad de la enfermedad.



**Figura 3. Concentración de SCFA en deposiciones de niños sanos y con diarrea.** Niveles de SCFA en muestras obtenidas de niños con diarrea positiva para patotipos de ECD (rojo) y niños sanos (azul), las cuales se analizaron por la compañía MS-OMICS. \* $p < 0,05$ ; ANOVA. Imagen de datos no publicados.

## 2 PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los estudios realizados en nuestros laboratorios demuestran que existe una microbiota y un metaboloma diferente en deposiciones de niños con diarrea positivos para ECD a comparación de deposiciones de niños sanos. Además, se tiene evidencia que los SCFA participan en la regulación de factores de virulencia de enteropatógenos y un estudio preliminar halló los niveles de acetato, propionato y butirato aumentados en deposiciones de niños con diarrea positiva para ECD en comparación con muestras de niños sanos. Dado estos antecedentes, la hipótesis que se plantea en este trabajo es:

“Los niveles de SCFA en deposiciones de niños con diarrea por ECD están significativamente aumentados en comparación de niños sanos, lo que se asocia a una microbiota intestinal productora de estas moléculas”

### **Objetivo General**

Cuantificar los niveles de SCFA e identificar bacterias de la microbiota intestinal productoras de estas moléculas en muestras de deposiciones de niños menores de 5 años con diarrea por ECD y niños sanos.

### **Objetivos específicos:**

1. Determinar la concentración de acetato, propionato y butirato en deposiciones de niños con diarrea por ECD y niños sanos
2. Correlacionar los niveles de SCFA con microorganismos productores de SCFA presentes en la microbiota intestinal de niños con diarrea por ECD y niños sanos

## **3 METODOLOGÍA**

### **3.1 Objetivo específico 1: Determinar la concentración de acetato, propionato y butirato en deposiciones de niños con y sin diarrea por ECD**

Para cuantificar los SCFA contenidos en muestras fecales se utilizó la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En primera instancia se estandarizó el método para la determinación de SCFA, basado en un protocolo descrito previamente (De Baere y cols., 2013). Posteriormente, el método cuantitativo propuesto se validó internamente para cada SCFA, a través de un conjunto de parámetros indicados por la guía práctica del Instituto de Salud Pública (ISP) sobre la validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos” (Duffau y cols., 2010). Una vez estandarizado y validado el método de HPLC, se procedió a cuantificar acetato, propionato y butirato en muestras de deposición de niños agrupados en 2 grupos: niños con diarrea positiva para cepas de ECD y niños sanos negativos para patógenos intestinales.

#### **3.1.1. Estandarización y validación de HPLC para determinar la concentración de SCFA**

##### **Compuestos químicos y reactivos**

El ácido acético (AA), el ácido propiónico (AP) y el ácido butírico (AB) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Bornem, Bélgica). Se preparó una solución stock combinada (SC) de los estándares AA, AP y AB a una concentración de 50 mM y se almacenaron a -4°C. Las soluciones de Bifosfato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), dietiléter y NaOH se obtuvieron desde Sigma-Aldrich. Se utilizó ácido clorhídrico (HCL fumante, 37%) grado analítico, y el agua y el acetonitrilo grado HPLC.

## **Preparación de las muestras**

- Curva de calibración y muestras blanco: Para cada análisis se preparó una curva de calibración y una muestra blanco. Para la muestra blanco se utilizó 1 mL de agua HPLC, y para la curva de calibración se hicieron las soluciones a partir de las soluciones SC de los estándares, de acuerdo a las siguientes concentraciones: 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM y 25 mM.
- Extracción líquido-líquido: Por cada mL de muestra analítica (calibradores, muestra blanco y muestras del estudio) se añadieron 100  $\mu$ l de HCl concentrado y se mezcló por 15 seg. Las muestras se extrajeron durante 20 minutos por laminación suave, utilizando 5 ml de dietiléter. Luego, se centrifugaron por 5 min a 3500 rpm a 4°C, y el sobrenadante obtenido se transfirió a otro tubo para añadir 500  $\mu$ l de una solución 1M de NaOH. Las muestras se volvieron a extraer por 20 minutos por laminación suave, seguido de un paso de centrifugación en las mismas condiciones mencionadas. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y finalmente se añadieron 100  $\mu$ l de HCl concentrado. Después de mezclar vigorosamente, se inyectó una alícuota de 20  $\mu$ l en el equipo de HPLC-UV (Agilent technologies serie 1260 infinity).

## **Método de validación interna**

- Linealidad: La linealidad del método se evaluó analizando las concentraciones de la curva de calibración: 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM y 25 mM. Todas las muestras de calibrador se inyectaron una vez por tres días seguidos en el instrumento HPLC-UV.
- Exactitud y precisión: La precisión y exactitud entre días se evaluó analizando 3 muestras de diferentes concentraciones (5, 10 y 25 mM) durante 3 días consecutivos. El criterio de aceptación para la exactitud fue que el % de recuperación esté dentro del rango 98%-102%. Para la precisión, la desviación estándar relativa (RSD) debía ser menor o igual a 2 % ( $\leq 2\%$ ).
- Repetibilidad: Para evaluar la repetibilidad se analizaron 6 muestras de una misma concentración en un mismo día, conservando siempre las mismas

condiciones de análisis. El RSD debe ser  $\leq 2\%$  para cumplir con los requisitos de aceptación.

- Reproducibilidad: Para evaluar la reproducibilidad se cambió una variable del análisis, en esta ocasión, se cambió al analista. Cada analista (1 y 2) analizó 10 muestras de una misma concentración en un mismo día. Para cumplir los criterios de aceptación, tanto analista 1 como analista 2, deben tener un RSD  $\leq 2\%$ .
- Límite de detección (LD): El límite de detección se evaluó al medir 10 muestras blanco de agua grado HPLC, las cuales al interpolar sus áreas en la curva de calibración correspondiente dan como resultados 10 concentraciones. Al sacar la desviación estándar (S) de estas concentraciones se pudo aplicar la siguiente fórmula:  $LD = 3,29 * S$
- Límite de cuantificación (LC): El límite de cuantificación se evaluó de la misma manera que el LD, no obstante, en esta ocasión se debe aplicar la siguiente fórmula:  $LC = 10 * S$
- Robustez: La robustez se evaluó según la prueba de Younden y Steiner, la cual consiste en 8 mediciones en 8 variables/condiciones. Se calculó el efecto de cada una de las variables sobre la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas de los parámetros del método. Se promedió las 4 mediciones en su valor más alto (X) y las 4 que corresponden al valor más bajo (x). Cuanto mayor sea la diferencia de los resultados entre el valor mayor y el valor menor ( $\Delta = X - x$ ), mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico. El criterio de aceptación debe cumplir  $\Delta < \sqrt{2} * S$ .

### **3.1.2 Determinación de la concentración de ácidos grasos de cadena corta en deposiciones de niños con diarrea y sanos**

#### **Análisis HPLC-UV**

El sistema empleado consistió en HPLC–UV *Agilent technologies* serie 1260 *infinity*. La separación cromatográfica se realizó en una columna *Hypersil Gold aQ* (150 mm × 4,6 mm i.d.) con partículas de tamaño 3 µm (Sercolab, Merksem, Bélgica). Las columnas fueron termostalizadas a 30°C y la fase móvil consistió en 20 mM de Bifosfato de sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) preparado en agua HPLC (pH ajustado a 2,2 usando HCl concentrado) (A) y Acetonitrilo (B). La fase móvil tuvo una proporción 80%A/20%B, con una velocidad de flujo de 1 ml/min. El detector UV se ajustó a una longitud de onda de 210 nm.

#### **Cálculo tamaño muestral**

Para determinar el número de muestras requeridas, se utilizó el programa G-Power, considerando los siguientes valores estadísticos: (i) un error tipo I igual a 0,05, indicando que se acepta una probabilidad del 5% de rechazar incorrectamente la hipótesis nula y (ii) una potencia de 0,8, lo que indica que hay un 20% de probabilidad de aceptar la hipótesis nula siendo incorrecta. Se utilizó un valor de tamaño de efecto 0,7960513, el cual representa la magnitud de diferencia entre los dos grupos de estudio. Este valor fue obtenido a partir de un estudio piloto, en donde se cuantificó los SCFA en 8 muestras por cada grupo. Con estos datos, se obtuvo que para el siguiente estudio se requiere de 52 muestras totales, es decir, un mínimo de 26 muestras para cada grupo.

#### **Muestras de estudio**

Las muestras de deposición positivas para algún patógeno ECD se recolectaron a partir de personas que consultaron en la clínica Las Condes y el hospital Luis Calvo Mackenna por un cuadro de diarrea aguda. Por otro lado, las muestras de pacientes sanos que aceptaron participar en el estudio se recolectaron de forma voluntaria. Ambos grupos de muestras se sometieron a un análisis por la plataforma Filmarray® (FA), un panel gastrointestinal que permite la detección múltiple de 22

patógenos gastrointestinales que incluyen virus, parásitos y bacterias. Para ambos grupos, las muestras cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión: La edad de los pacientes debe estar en un rango de 12 meses a 60 meses (1 a 5 años), ningún niño debe haber consumido antibióticos ni probióticos al menos 3 meses antes de enrolarse en el estudio. Los niños sanos no deben tener signos clínicos de enfermedades gastrointestinales previas, como vómito, diarrea, anorexia o pérdida de peso, además de ser negativas para patógenos gastrointestinales. Las muestras de deposiciones de niños con diarrea deben ser positivas solo para alguno de los 6 patotipos de ECD. Después de la selección de las muestras, estas se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, Santiago de Chile, hasta el momento de su análisis. La caracterización de las muestras del estudio son señaladas en la tabla 3. El estudio donde se obtuvieron las muestras cuenta con la aprobación de los Comités de ética de Clínica las Condes y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 1).

### **Extracción fecal**

Las muestras de diarrea recolectadas se encontraban en medio Cary Blair (Remel, *Thermo Fisher Scientific*) desde el inicio, por lo que las muestras de los niños sanos se diluyeron en este mismo medio. Posteriormente, ambos grupos de muestra se sometieron a extracción fecal, la cual consistió en añadir 1 ml de agua libre de nucleasas a 500  $\mu\text{l}$  de materia fecal, luego se mezcló vigorosamente hasta obtener una pasta homogénea. La muestra se centrifugó a  $16.000 \times g$  por 30 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para volver a centrifugar a  $16.000 \times g$  por 30 minutos. Obteniendo sobrenadante, el cual se filtró en filtros de jeringas de 30 mm x 0,22  $\mu\text{m}$  (TCL *Technology*) para obtener agua fecal (SCFA), y un pellet (masa húmeda), el cual se pesó y se utilizó para normalizar los datos obtenidos de la cuantificación. El agua fecal se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **Verificación del método HPLC**

Se realizó una pequeña verificación del método validado, puesto que las condiciones de la matriz que contiene la muestra cambiaron de agua a medio Cary Blair (CB). Para esto se analizó la linealidad del método, en donde se inyectaron las concentraciones 0,5 mM, 5 mM y 25 mM por tres días consecutivos en el instrumento HPLC-UV.

### **Análisis estadístico**

Para evaluar la significancia estadística de los niveles de SCFA entre niños con diarrea y niños sanos se empleó la prueba de Mann-Whitney, el cual es un método no paramétrico que compara dos grupos de muestra no pareadas y de distribución anormal. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$ . Luego a través de ANOVA de dos vías de múltiples comparaciones se evaluó si existía una diferencia estadística entre los niveles de SCFA encontrados y los principales patotipos de ECD. Considerando una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$ .

### **3.2 Objetivo específico 2: Correlacionar los niveles de SCFA con microorganismos productores de SCFA presentes en la microbiota intestinal de niños con diarrea por ECD y niños sanos.**

De acuerdo a protocolos previamente estandarizados en el laboratorio (Gallardo y cols., 2017) se identifica la composición de la microbiota en las muestras de diarrea positivas para ECD y niños sanos. Luego, se determinaron los principales géneros de bacterias productoras de SCFA en estas muestras y se evaluó si había cambios significativos en ambos grupos de muestras. Finalmente, se evaluó la existencia de una correlación entre los niveles de SCFA encontrados y una microbiota productora de estas moléculas.

### **3.2.1. Identificación de la microbiota intestinal de deposiciones de niños con diarrea por ECD y niños sanos**

#### **Extracción de ADN y amplificación del gen 16S rRNA**

Las muestras positivas para patotipos ECD y de niños sanos se sometieron a extracción de ADN, utilizando el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen), y luego se cuantificaron con el espectrofotómetro Synergy-HT (Biotek TM). Las extracciones de ADN se enviaron a MrDNA (Estados Unidos), donde se sometieron a amplificación por PCR del gen que codifica el ARN ribosomal 16S (16S rRNA), y luego se secuenció la región V3-V4 del gen rRNA mediante illumina miseq 2X300 pb.

#### **Identificación de la microbiota intestinal**

En el laboratorio, las secuencias se analizaron utilizando los programas Qiime2 y DADA2, donde en un procesamiento inicial se eliminaron las secuencias de baja calidad, es decir, menores de 300 pb, con más de 8 homopolímeros y secuencias ambiguas. Posteriormente se realizó la agrupación de las secuencias con 100% de identidad en *Amplicon sequence variant* (ASV), la cual es una unidad de clasificación que permite diferenciar secuencias con tan solo un cambio de nucleótido. Cada ASVs se alineó utilizando la base de datos Silva 138 para su clasificación taxonómica. A partir de esta información, se logró clasificar la microbiota presente en cada muestra a nivel de Reino, Filo, Clase, Orden, Familia, Género y Especie. Mediante un análisis de redundancia se evaluó las comunidades microbianas de cada grupo, lo que permitió visualizar gráficamente la organización de las muestras de acuerdo a la similitud que presentaban en la composición de la microbiota y del grupo que pertenecen.

Con los datos obtenidos de la composición de microbiota se pudo obtener la cantidad de cada ASVs presente en las muestras, luego los datos se transformaron a través de raíz cuadrada, y a partir de esto se calculó el % de cada taxa con respecto al total (abundancia relativa). No se incluyeron en el análisis taxa que no pertenecían al reino bacteria y se procedió a evaluar los niveles de abundancia

relativa para filo y familia, además de diferentes géneros asociados a la producción de SCFA: *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Dialister*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Roseburia*, *Blautia*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Anaerostipes*, *Phascolarctobacterium*, *Coproccus*, *Megasphaera*, *Eubacterium* y *Oscillospira*.

### **3.2.2 Correlación entre los niveles de SCFA encontrados con géneros de bacterias productores de SCFA en las muestras de diarrea por ECD y niños sanos**

La correlación entre los principales géneros productores de SCFA y los SCFA evaluados: acetato, propionato y butirato, se realizó utilizando el programa estadístico *R* (versión: 4.1.1) mediante el paquete *corrplot* (Wei y Simko, 2017), el cual se basa en una correlación euclidiana. Este tipo de análisis correlaciona la abundancia de cada género productor de SCFA con los niveles encontrados del respectivo SCFA, y se realizó de forma independiente para el grupo de niños con diarrea positivos para ECD y para niños sanos sin diarrea.

#### **Análisis estadístico**

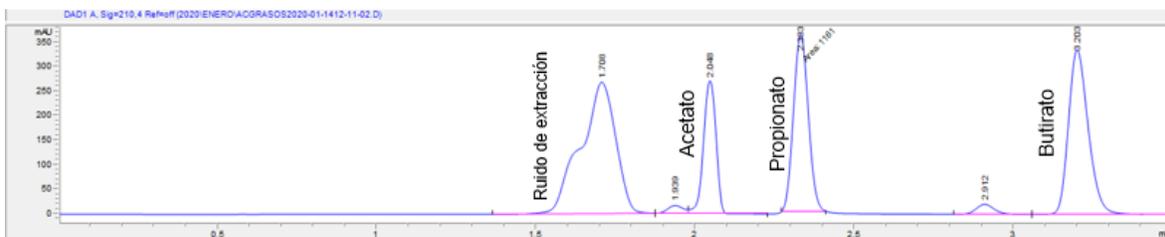
A través del análisis estadístico Mann-Whitney de comparación múltiple, se comparó los niveles de abundancia relativa a nivel de filo, familia y para diferentes géneros productores de SCFA entre el grupo de niños sanos y niños con diarrea por ECD. Considerando una diferencia significativa cuando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados del Objetivo N°1. Determinar la concentración de acetato, propionato y butirato en deposiciones de niños con diarrea por ECD y niños sanos

#### 4.1.1 Estandarización y validación del método HPLC

La estandarización del método de HPLC para la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta se realizó en una columna *Hypersil Gold aQ* con partículas de tamaño 3  $\mu\text{m}$ , con un sistema isocrático con proporción de fase móvil de Bifosfato de sodio/Acetonitrilo = 80/20 y un flujo de 1 ml/min, logrando una separación aceptable de los tres ácidos grasos estudiados (Fig. 4). Además, al cuantificar sin el proceso de extracción se comprobó que la extracción líquido-líquido descrita previamente es esencial para obtener y separar los analitos del ruido de extracción, el cual corresponde a productos inespecíficos formados durante la extracción que son escasamente retenidos en la columna, por lo que se eluyen a tiempos muy tempranos.



**Figura 4. Cromatograma de estándares de SCFA a una concentración de 25 mM.**

Ruido de la extracción a un tiempo de retención (tr) de 1,707 min y área de 2253,9 mAU. Peak de acetato a un tr de 2,048 min y área de 738,7 mAU. Peak de propionato a un tr de 2,3 min y área de 1161 mAU y peak de butirato a un tr de 3,2 min y área de 1434,4 mAU.

La validación interna del método cumplió con todos los criterios de aceptación señalados en el manual de ISP (tabla 1). La linealidad iba desde 0,5 mM a 25 mM, con un  $r \geq 0,99$  y un  $t$  crítico  $> t$  calculado para los 3 SCFA. Para la exactitud y precisión, los valores estaban entre el 98-102% de recuperación y la desviación estándar relativa (RSD) fue  $\leq 2\%$  para los 3 SCFA. Tanto para la reproducibilidad y repetibilidad, los 3 SCFA cumplían con  $RSD \leq 2\%$ . Los límites de cuantificación y detección se calcularon según las fórmulas señaladas en el manual y la robustez cumplía con el siguiente criterio  $(X-x) < \sqrt{2} S$ .

**Tabla 1.** Parámetros de validación del método de HPLC para los 3 SCFA evaluados

Parámetro	SCFA		
	Acetato	Propionato	Butirato
Linealidad ( $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ )	49,9>3,2	52,2>3,2	77,4>3,2
	R>0,99	R>0,99	R>0,99
Exactitud (%)	101,3	100,9	101,5
Precisión (RSD)	2	1,9	1,7
Reproducibilidad (RSD)	1,43	1,45	1,23
Repetibilidad (RSD)	A1=1,55	A1=1,96	A1=1,47
	A2=2,03	A2=1,89	A2=1,77
Límite de cuantificación (mM)	0,493	0,113	0,247
Límite de detección (mM)	0,162	0,037	0,097
Robustez (X-x)	< 296,2	< 345,7	< 356,8

#### 4.1.2 Cuantificación de acetato, propionato y butirato en muestras de deposición de niños con diarrea y sin diarrea por ECD

Para este estudio se utilizaron muestras fecales de 38 niños con diarrea positiva para algún patógeno ECD (grupo diarrea) y 30 niños sanos negativos para patógenos gastrointestinales (grupo control). La edad media de los pacientes con diarrea y los pacientes control fue de 36,4 meses (mínimo a máximo: 12 a 60 meses) y 36,1 meses (mínimo a máximo: 12 a 61 meses), respectivamente. No hubo diferencia significativa en la edad entre los 2 grupos ( $p > 0,99$ ). De los niños con diarrea: 10 eran positivos para EAEC, 9 corresponden a EPEC, 6 para ETEC, 11 para STEC y 2 para EIEC (Tabla 2). En cuanto a las características de los pacientes, se logró recopilar la información del sexo, tipo de parto, presencia de alguna patología intestinal, cirugía previa, presencia de alergias, si fueron alimentados por lactancia materna y antecedentes de probióticos (Tabla 3). Debido a que se enrolaron de forma voluntaria en el estudio, se logró solamente caracterizar a cada individuo sano, lo cual no se pudo aplicar para los individuos con diarrea. A pesar que uno de los niños tenía antecedente de rotavirus, este no fue detectado cuando se analizó la muestra por Filmarray. 6 niños presentaban algún tipo de alergia, entre ellas 2 dermatitis atópica, indeterminada, huevo/mango, plátano y alergia a la proteína de Leche de Vaca (APLV)/alergia Alimentaria Múltiple (AAM). Finalmente, 7 niños tenían antecedentes de consumir probióticos, no obstante, ningún niño consumió 3 meses antes de enrolarse en este estudio. La caracterización de los pacientes no se utilizó como criterio de inclusión ni de exclusión.

**Tabla 2.** Edad media y patógenos de las muestras del grupo control y diarrea

	Edad media (meses)	Patógenos (Patotipos de ECD)
Grupo control	36,1	Negativos
Grupo diarrea	36,4	10 EAEC 9 EPEC 6 ETEC 11 STEC 2 EIEC

**Tabla 3.** Características de las 30 muestras de deposición de niños sanos sin diarrea

Sexo	Parto	Patología intestinal	Cirugía previa	Alergias	Lactancia Materna	Probióticos
(18) Mas	(16) Parto natural	(29) No	(30) No	(6) Si	(29) Si	(7) Si
(12) Fem	(14) Cesárea	(1) Rotavirus		(24) No	(1) No	(23) No

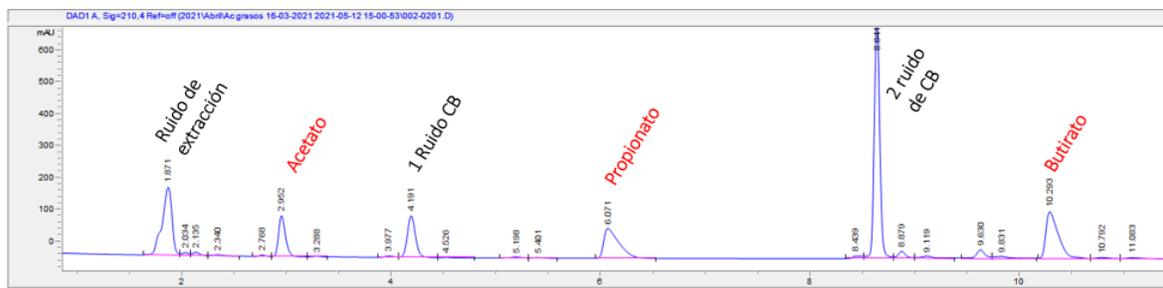
Todas las muestras del estudio se encontraban en medio CB a la hora de su cuantificación, el medio CB es utilizado para la conservación del patógeno y debido a sus componentes para proveer un bajo potencial de redox y su alto pH, provocó que al momento de cuantificar las muestras aparecieran ruidos propios del medio (interferentes). Debido al aumento en las señales interferentes se generó una cercanía entre los tiempos de retención de los analitos y los ruidos de extracción propios del método y del medio CB. Por esta razón, se modificó el sistema isocrático descrito previamente a un sistema en gradiente (tabla 4), logrando una mejor separación de los analitos de interés de los ruidos de extracción (Fig.5), no obstante, el tiempo de corrida se alargó a 11 minutos. Se realizó una verificación con las nuevas condiciones, puesto que al realizar un cambio en las condiciones del método es necesario emplear pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo. En este caso se analizó la linealidad, la cual cumplió con los criterios de aceptación requeridos (tabla 5).

**Tabla 4.** Condiciones del sistema en gradiente empleado en la cuantificación de SCFA

Tiempo (min)	A(%)	B(%)	Flujo (ml/min)
0	100	0	1
5	100	0	1
5,2	90	10	1
10	90	10	1
10,2	100	0	1

**Tabla 5.** Verificación del método HPLC para los 3 SCFA evaluados

Parámetro	Acetato	Propionato	Butirato
Linealidad	40,81>12,7 R>0,99	31,6>12,7 R>0,99	49,98>12,7 R>0,99

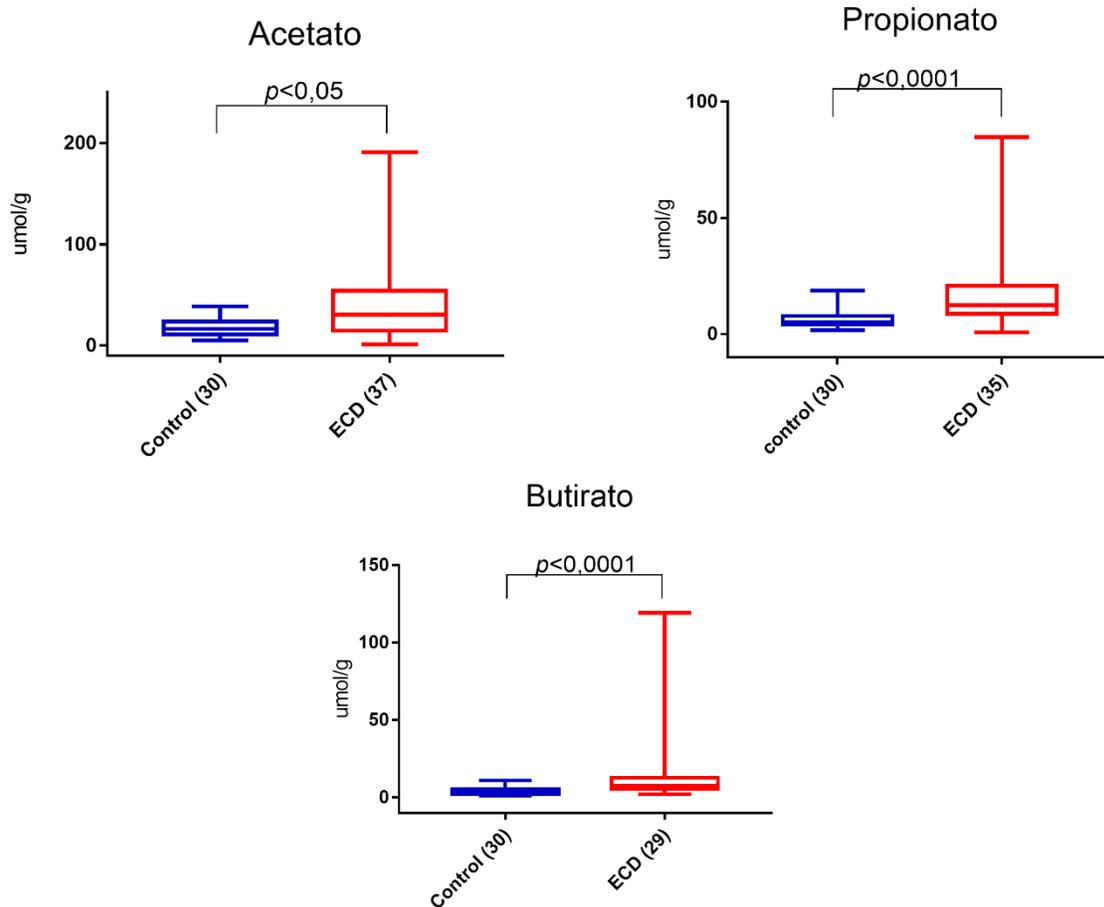


**Figura 5. Cromatograma de estándares de SCFA en medio CB a una concentración de 25 mM.** Ruido de la extracción química a un tr de 1,9 min con área de 1359,7 mAU. Señal de acetato a un tr de 2,9 min con área de 674,8 mAU. Primer ruido del medio CB a un tr de 4,2 min con área de 603,5 mAU. Señal de propionato a un tr de 6 min con área de 1096,3 mAU. Segundo ruido del medio CB a un tr de 8,8 min con área de 2503,9 mAU y señal de butirato a un tr de 10,3 min con área de 1443,8 mAU.

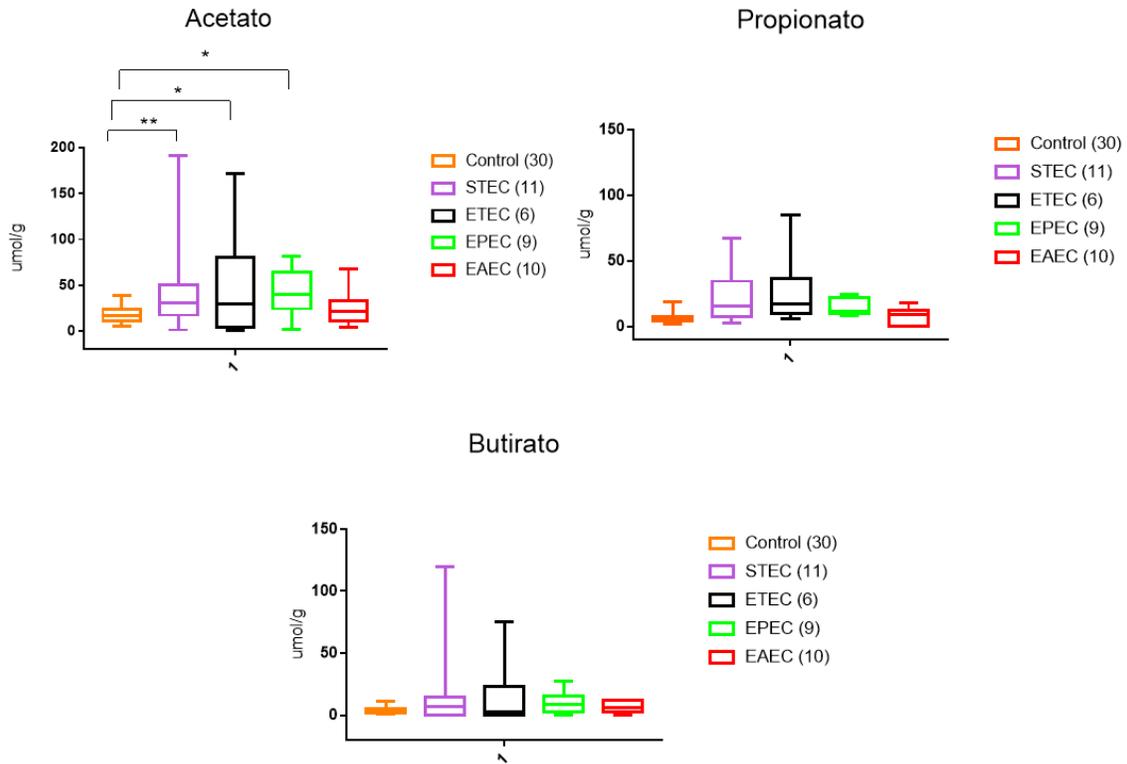
Al cuantificar las muestras se obtuvo la concentración en mM, no obstante, para tener en cuenta la diferencia en el contenido de agua entre las muestras fecales, las concentraciones finales de SCFA se normalizaron por materia fecal y los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol/g}$  de materia fecal (Minamoto y cols., 2019). Cuando se comparó los niveles de ácidos grasos se evidenció que los niveles de acetato en el grupo ECD estaban significativamente elevados a comparación del grupo control (41,48 vs 18,15  $\mu\text{mol/g}$ ;  $p < 0,05$ ; Fig.6). De las 68 muestras utilizadas en el estudio, una de ellas perteneciente al grupo ECD daba una concentración menor al límite de cuantificación (menor a 0,493 mM de acetato, tabla 1), por lo que no se incluyó en la estadística. Para el caso de propionato, también se encontró que los niveles estaban significativamente aumentados en el grupo ECD a comparación del grupo control (17,87 vs 6,72  $\mu\text{mol/g}$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 6), en este caso no se consideraron 3 muestras del grupo ECD que estaban por debajo del límite de cuantificación (0,113 mM, tabla 1). Por último, butirato también evidenció una elevada concentración en el grupo ECD a comparación del grupo control (15,02 vs 4,02  $\mu\text{mol/g}$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig.6), y en este caso no se consideraron 9 muestras del grupo ECD, las cuales daban menor al límite de detección (0,097 mM, tabla 1).

Al observar niveles elevados de SCFA en niños con diarrea versus niños sanos, se procedió a evaluar si existe una diferencia en los niveles de acetato, propionato y butirato dependiendo del patotipo de ECD presente en las muestras de niños con diarrea con respecto a niños sanos. Este análisis evidenció que solamente acetato

estaba elevado en STEC (48,13 vs 18,15  $\mu\text{mol/g}$ ;  $p<0,01$ ), ETEC (47,75 vs 18,15  $\mu\text{mol/g}$ ;  $p<0,05$ ) y EPEC (43,33 vs 18,15  $\mu\text{mol/g}$ ;  $p<0,05$ ) con respecto a las muestras de niños sanos negativos para patógenos gastrointestinales (Fig.7).



**Figura 6. Concentración de SCFA en deposiciones de niños con diarrea y sanos.** Las concentraciones de SCFA se expresan en  $\mu\text{mol/gramo}$  de materia fecal. Los individuos positivos para ECD se señalan en rojo (ECD) e individuos sanos señalados en azul (Control). Se empleó el test estadístico Mann-Whitney, considerando una diferencia significativa cuando  $p<0,05$ , se gráfica 1-99% de los datos.

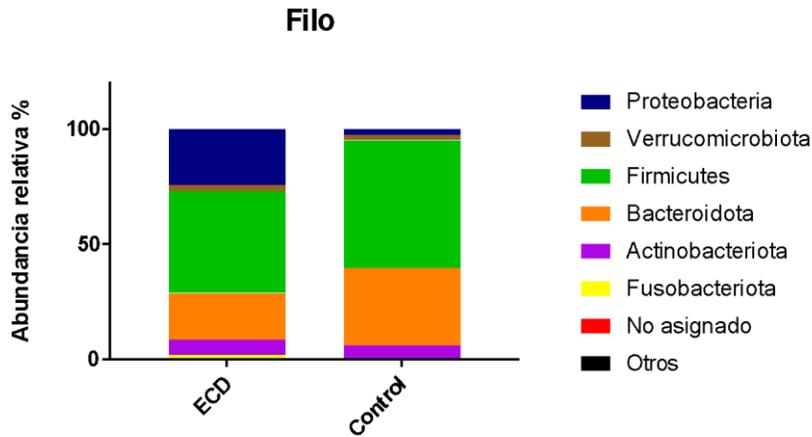


**Figura 7. Concentraciones de SCFA por patotipos ECD en niños con diarrea.** Los niveles de SCFA se expresan en  $\mu\text{mol/g}$ . En naranja las muestras del grupo control con, en morado STEC, en negro ETEC, en verde EPEC y en rojo EAEC. El test estadístico utilizado fue ANOVA de dos vías de múltiples comparaciones, considerando diferencia significativa cuando  $p < 0,05$ , se gráfica 1-99% de los datos. \*\* $p < 0,01$  y \* $p < 0,05$

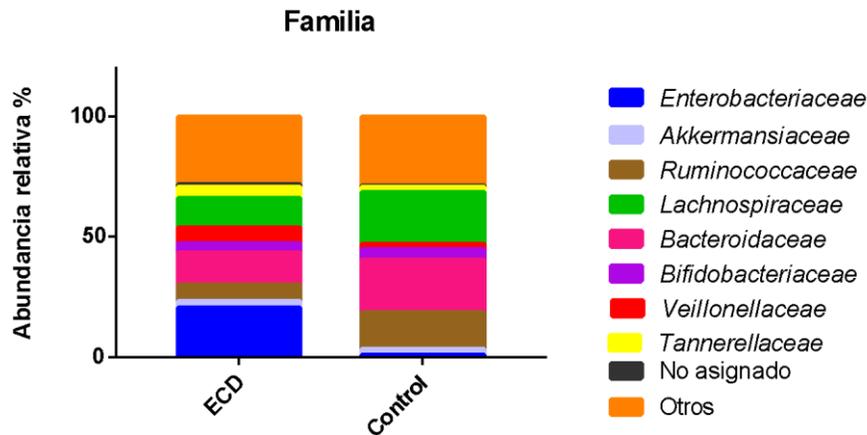
## **4.2 Resultados objetivo 2. Correlacionar los niveles de SCFA con microorganismos productores de SCFA presentes en la microbiota intestinal de niños con diarrea por ECD y niños sanos**

### **4.2.1 Identificación de la microbiota intestinal en niños con diarrea por ECD y niños sanos**

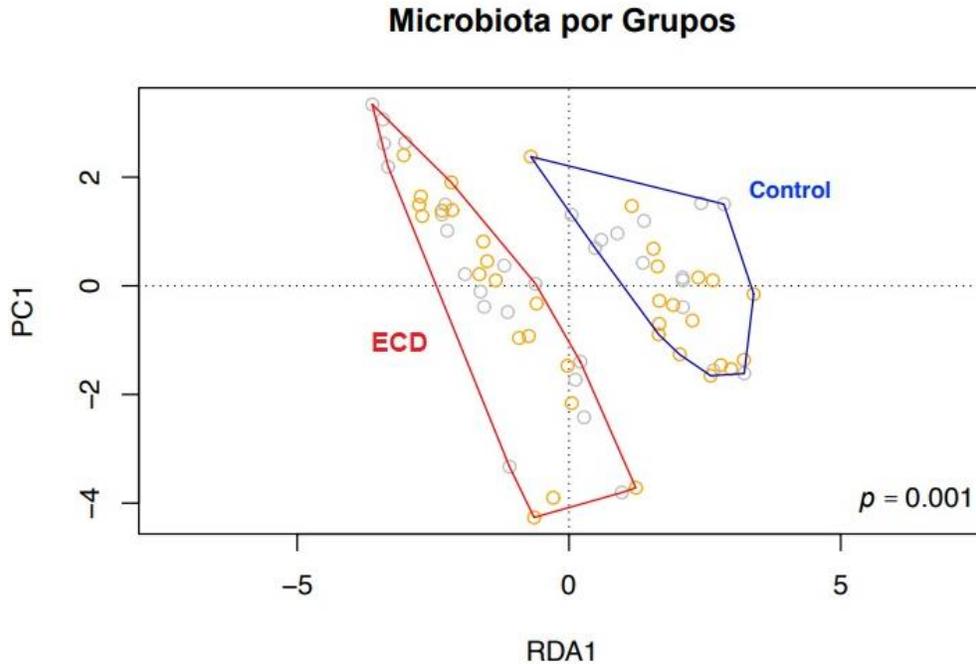
En el estudio de microbiota intestinal se reconocieron 464 taxas en total, logrando identificar 13 filos diferentes, 89 familias, 202 géneros y 134 especies. Con la información obtenida de la identificación taxonómica junto a los datos de abundancia relativa de cada muestra se pudo comparar las comunidades microbianas de los 2 grupos estudiados. A nivel de filo las muestras del grupo ECD poseían una mayor proporción de Proteobacteria (24,07% vs 2,2%  $p < 0,001$ ) y una menor proporción de Bacteroidetes (20,1% vs 33,7%  $p < 0,001$ ) a comparación del grupo control (Fig. 8). A nivel de familia el grupo ECD poseía una mayor proporción de *Enterobacteriaceae* (20,7% vs 1%  $p < 0,001$ ) a comparación del grupo control (Fig.9). Sin embargo, se encontró una menor proporción de las familias *Ruminococcaceae* (6,9% vs 15,3%  $p < 0,001$ ), *Bacteroidaceae* (13,27% vs 21,95%  $p < 0,001$ ) y *Lachnospiraceae* (12,3% vs 21,4%  $p < 0,001$ ) a comparación del grupo control (Fig.9). Para evaluar la distribución de las muestras en función de la similitud en la composición de su microbiota y del grupo al que pertenecen, se realizó un análisis de redundancia, donde se evidenció que las muestras ECD presentaban una composición de microbiota distintiva respecto a las muestras control (ANOVA  $p < 0,001$ ) (Fig.10). Considerando que la composición de la microbiota sufre cambios entre niños de 1-3 años y 3-5 años (Derrien y cols., 2019), se evaluó el rango etario tanto para ECD como control. Evidenciando que no hubo una agrupación por rango etario en ninguno de los dos grupos evaluados (Fig.10).



**Figura 8. Composición de la microbiota a nivel de filo en niños con diarrea por ECD y niños sanos.** Se representaron las 6 unidades taxonómicas más abundantes, mientras que aquellas menos abundantes se agruparon como otros. Las secuencias en las que no se logró la identificación taxonómica se clasificaron como no asignado. Se utilizó el test estadístico Mann-Whitney, considerando una diferencia significativa cuando  $p < 0,05$ .



**Figura 9. Composición de la microbiota a nivel de familia en niños con diarrea por ECD y niños sanos.** Se representaron las 8 unidades taxonómicas más abundantes, mientras que aquellas menos abundantes se agruparon como otros. Las secuencias en las que no se logró la identificación taxonómica se clasificaron como no asignado. Se utilizó el test estadístico Mann-Whitney, considerando una diferencia significativa cuando  $p < 0,05$ .



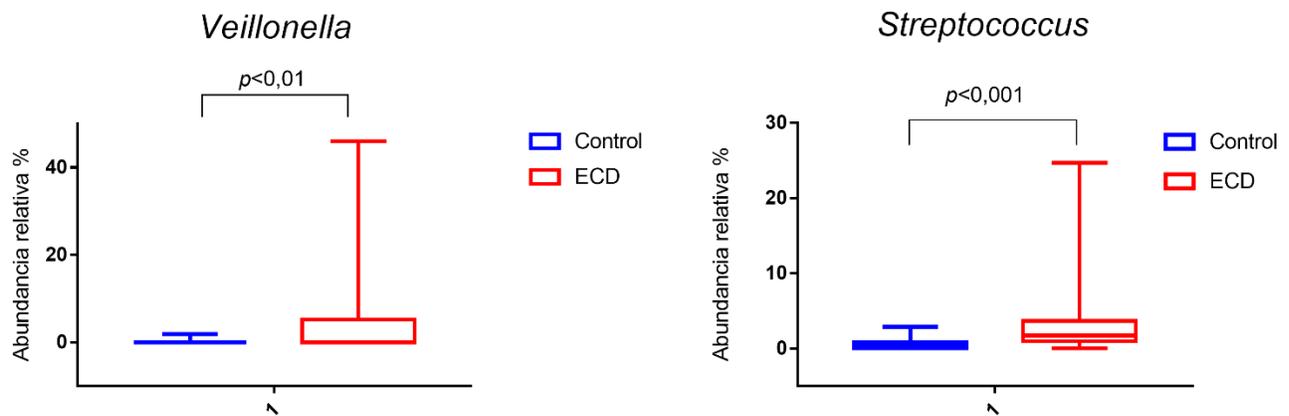
**Figura 10. RDA de deposiciones de niños con diarrea por ECD y niños sanos.**

Análisis de correlación entre las diferentes muestras del estudio que permite observar la distribución de las comunidades microbianas y su organización de acuerdo al grupo al que pertenecen. En rojo se señalan las muestras de diarrea positivas para ECD y en azul las muestras de niños sanos. Se indica el rango etario de cada muestra dentro del grupo, 12-36 meses en color gris y 37-60 meses en naranja. El análisis estadístico de la agrupación de las muestras se determinó mediante ANOVA utilizando el programa estadístico R Studio.

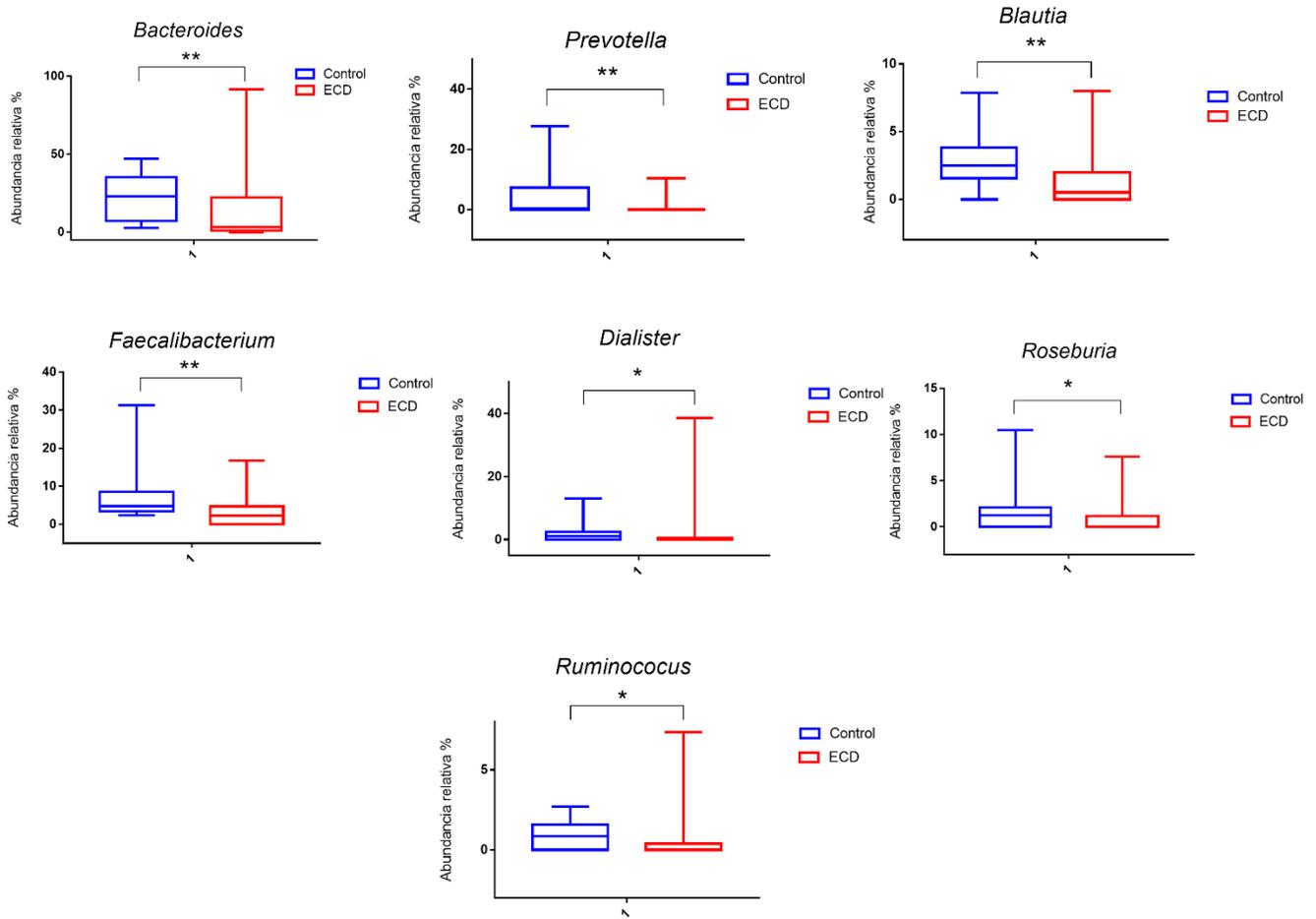
#### 4.2.2. Determinación de los microorganismos productores de SCFA en deposición de niños con diarrea y sin diarrea por ECD

Se analizó los microorganismos productores de SCFA a nivel de género, evidenciando que el género *Veillonella* y *Streptococcus* estaban significativamente aumentados en niños del grupo ECD a comparación de niños del grupo control (4,9% vs 0,2%,  $p < 0,01$  y 3,9% vs 0,6%  $p < 0,001$ , respectivamente) (Fig.11). No obstante, también se encontró una disminución de 7 géneros de bacterias productoras de ácidos grasos en el grupo ECD a comparación del grupo control (Fig.12), correspondiendo a *Bacteroides* (13,27% vs 21,95%  $p < 0,001$ ), *Prevotella* (0,69% vs 5%  $p < 0,001$ ), *Blautia* (1,4% vs 2,89%  $p < 0,001$ ), *Faecalibacterium* (3,36

vs 6,78%  $p<0,001$ ), *Dialister* (1,55 vs 1,82%  $p<0,01$ ), *Roseburia* (0,91% vs 1,75%  $p<0,01$ ) y *Ruminococcus* (0,67% vs 0,93%  $p<0,01$ ).



**Figura 11. Abundancia relativa de los géneros de bacterias productoras de SCFA aumentados en ECD versus control.** En azul se indica el grupo control y en rojo el grupo ECD. *Veillonella* 4,9% vs 0,2%  $p<0,01$  y *Streptococcus* 3,9% vs 0,6%  $p<0,001$ . Se utilizó el test estadístico Mann-Whitney, considerando una diferencia significativa cuando  $p<0,05$ , se gráfica 1-99% de los datos.

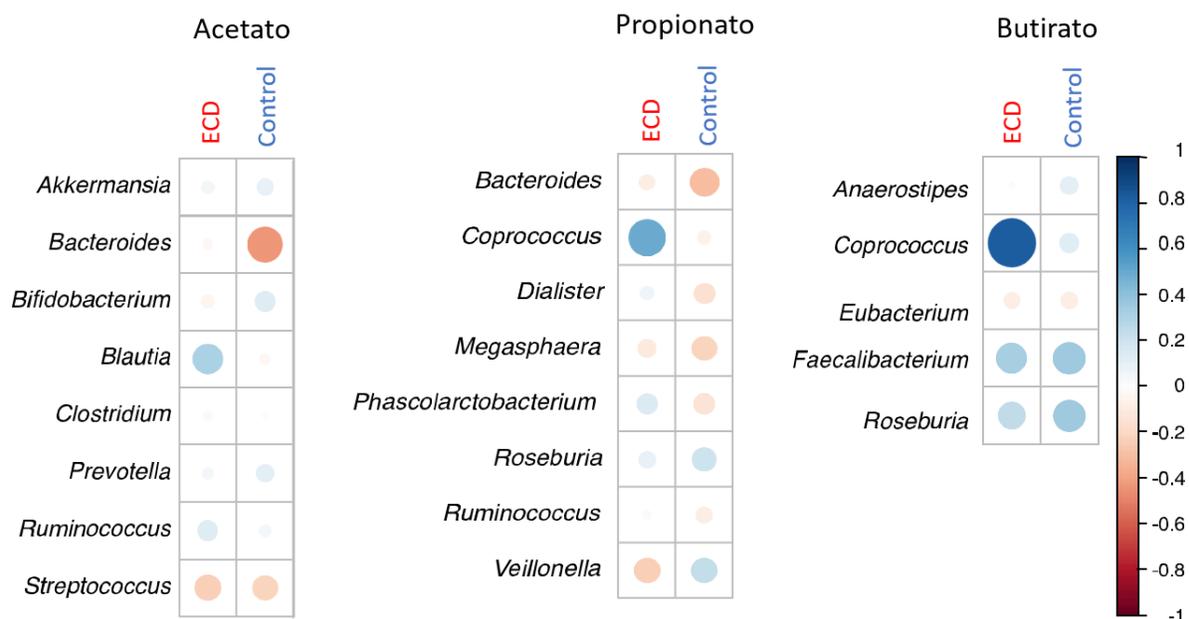


**Figura 12. Abundancia relativa de los géneros de bacterias productoras de SCFA disminuidos en ECD versus control.** En azul se indica el grupo control y en rojo el grupo ECD. *Bacteroides* 13,27% vs 21,95  $p < 0,001$ , *Prevotella* 0,69% vs 5%  $p < 0,001$ , *Blautia* 1,4% vs 2,89%  $p < 0,001$ , *Faecalibacterium* 3,36% vs 6,78%  $p < 0,001$ , *Dialister* 1,55% vs 1,82%  $p < 0,01$ , *Roseburia* 0,91% vs 1,75%  $p < 0,01$  y *Ruminococcus* 0,67% vs 0,93%  $p < 0,01$ . Se utilizó el test estadístico Mann-Whitney, considerando una diferencia significativa cuando  $p < 0,05$ , se gráfica el 1-99% de los datos.

\*\*  $p < 0,001$  y \*  $p < 0,01$

#### **4.2.3 Correlación entre niveles de SCFA y microorganismos productores de SCFA en deposición de niños con diarrea y sin diarrea por ECD**

Para evaluar si existe una correlación entre la abundancia de los géneros productores de SCFA y la producción de los 3 metabolitos cuantificados en muestras de deposición de ambos grupos de estudio, se utilizó el programa *R studio*. Encontrando una correlación positiva entre la producción de propionato y butirato con el género *Coprococcus* en el grupo ECD (Fig.13). En el caso de acetato, solamente el género *Blautia* mostró una correlación positiva en el grupo ECD. En la producción de butirato, los géneros *Faecalibacterium* y *Roseburia* mostraron una correlación positiva tanto en el grupo ECD como en el grupo control. En contraste, el género *Bacteroides* fue el único género que evidenció una clara correlación negativa en la producción de acetato y propionato en el grupo control (Fig. 13). A pesar que se observan otras correlaciones entre los niveles de SCFA con la abundancia de los géneros, estos no llegan a tener una intensidad prominente, por lo tanto, no se consideró una correlación entre ambos (Fig.13).



**Figura 13. Correlación entre los niveles de SCFA con microorganismos productores de SCFA en niños con diarrea y sanos.** Se muestra la correlación entre las intensidades de los 3 metabolitos principales que se evaluaron (Acetato, Propionato y Butirato) y la abundancia de los principales géneros de bacterias productores de SCFA, en muestras de heces de niños sanos (Control, azul) y niños con diarrea positivos para ECD (ECD, rojo). Los puntos azules y rojos representan correlaciones positivas y negativas, respectivamente, entre metabolitos y géneros. Este análisis se realizó utilizando el paquete *corrplot* para R.

## 5 DISCUSIÓN

Los patotipos ECD son los agentes etiológicos bacterianos más comunes de diarrea tanto en regiones en desarrollo como industrializadas, afectando principalmente a niños menores de 5 años (Press, 2014). Si bien se tiene un vasto conocimiento de las bases moleculares de la infección por ECD, los factores ambientales que regulan este proceso no han sido del todo esclarecidos. En el último tiempo, la microbiota intestinal ha cumplido un papel fundamental en la regulación de los mecanismos de patogenicidad de diversos enteropatógenos en el colon humano. Además, varios metabolitos producidos por la microbiota modulan la interacción entre la microbiota intestinal y enteropatógenos, como ECD (Vogt y cols., 2015). Dada su abundancia en el medio intestinal, los SCFA se han estudiado ampliamente como moléculas de señalización de enteropatógenos (Sun y O'riordan, 2013), incluyendo a ECD. Por esta razón, el principal objetivo de esta investigación consistió en determinar las concentraciones de SCFA e identificar las bacterias de la microbiota intestinal productoras de estas moléculas, en muestras de deposiciones de niños menores de 5 años con diarrea por ECD y niños sanos.

Una proporción significativa de carbohidratos ingeridos en la dieta escapa de la absorción en el intestino delgado y llega al colon. Aproximadamente, el 90% de los carbohidratos no absorbidos que ingresan al colon cada día son fermentados por las bacterias de la microbiota intestinal para producir los SCFA, que pueden ser absorbidos por los colonocitos, y eventualmente, ser metabolizados en el hígado (Hammer y cols., 1990). El efecto de los SCFA sobre bacterias intestinales ha sido de gran interés en el último tiempo, ya que los niveles elevados de estas moléculas tienen efectos tóxicos contra las bacterias, debido principalmente a que reducen el pH celular y son capaces de atravesar las membranas lipídicas de la célula bacteriana. Esta acción antibacteriana ha impulsado su uso como conservante en alimentos y en algunas aplicaciones clínicas (Bushell y cols., 2021). Sin embargo, también se ha descrito que la producción de SCFA en el colon tiene un papel crítico en la salud de los seres humanos, cumpliendo un papel crucial en los trastornos diarreicos (Binder, 2010). Por ejemplo, se ha evidenciado que cuando *S.*

Typhimurium se cultiva en medios que contienen una mezcla de SCFA con concentraciones encontradas en el íleon distal humano, la expresión de genes codificados en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1) aumentan, generando un incremento en la expresión de los genes de virulencia asociados a invasión (Lawhon y cols., 2002).

En el siguiente estudio, se encontró que las muestras de deposición de niños menores de 5 años con diarrea positiva para patotipos ECD tienen concentraciones de acetato, propionato y butirato significativamente más elevadas a comparación de muestras de deposición de niños sanos sin diarrea (Fig.6). Estos hallazgos concuerdan con investigaciones previas que han señalado un aumento de SCFA en enfermedades intestinales. Se han reportado mayores niveles de SCFA en pacientes que desarrollaron diarrea por recibir alimentación entérica. Generalmente este tipo de alimentación se asocia con el desarrollo de diarrea por *Clostridium difficile*, y se atribuye a la alteración en la composición de la microbiota intestinal que experimentan estos individuos (Whelan y cols., 2009). Por otro lado, se observó que pacientes con síndrome del intestino irritable (SII) presentaban proporciones significativamente mayores de propionato a comparación de personas sanas. Al realizar un estudio de subgrupos se evidenció que los pacientes con SII con predominio de diarrea tenían concentraciones de butirato mayores que personas sanas (Sun y cols., 2019). Otras investigaciones han evaluado el rol que tendría la producción de SCFA en la absorción intestinal de agua y electrolitos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ), ya que la absorción de SCFA en el colon se combina con la entrada de sodio, agua y cloro a través de un intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , y la activación del intercambiador paralelo de  $\text{Cl}^-$ / butirato, generando que los SCFA cumplan un rol fundamental en el equilibrio nutricional de electrolitos. Por lo tanto, la pérdida de este efecto resultaría en una pérdida neta de líquidos y electrolitos, que en conjunto con las fuerzas osmóticas de los carbohidratos no fermentados, causarían diarrea (Binder, 2010; Canani y cols., 2004). Por esta razón, se ha propuesto que el aumento en la producción de SCFA mejoraría la absorción de líquido en el colon corrigiendo la deshidratación asociada a la diarrea aguda (Liu y cols., 2019). Por lo tanto, nuestros resultados podrían deberse a un mecanismo compensatorio para la pérdida de

líquidos que ocurre durante la diarrea o que, de algún modo los SCFA cumplan otras funciones en el proceso infeccioso de ECD. Por ejemplo, actuar como moléculas de señalización en la respuesta inmune. Distintas investigaciones han señalado la importancia de la producción de SCFA en la respuesta inmune del hospedero, ya que los SCFA son capaces de desencadenar múltiples mecanismos para inhibir la inflamación del intestino presente durante la diarrea. Los colonocitos absorben los SCFA, especialmente butirato, el cual es capaz de interactuar con el sistema inmune a través de los receptores acoplados a proteína G (GPCR), y altera la expresión génica mediante la reducción de la actividad de las histonas desacetilasas (HDAC), generando una reducción de la inflamación local, protección contra la infiltración de patógenos y mantención de la integridad de la barrera intestinal (Yoo y cols., 2020).

Investigaciones recientes en personas que sufren de diarrea asociada a la administración de antibióticos, han demostrado que los tratamientos caseros, como los medicamentos tradicionales chinos, restauran la microbiota intestinal y mitigan la diarrea, lo que se atribuyó al aumento de SCFA encontrado (Yang y cols., 2021). No obstante, otras investigaciones han propuesto que los SCFA pueden actuar como moléculas de señalización y reguladores del metabolismo bacteriano. Por ejemplo, se ha descrito que acetato puede ser utilizado como fuente de carbono para cepas de *E. coli*, pero cuando *E. coli* se cultiva anaeróbicamente con glucosa como fuente de carbono y en ausencia de aceptores de electrones, condiciones similares a la microbiota intestinal, es capaz de producir acetato mediante la fermentación ácida mixta. Por lo tanto, *E. coli* puede tanto consumir como producir acetato, generando el llamado "acetate switch" entre estos dos estados metabólicos (Wolfe, 2005; Bushell y cols., 2021). El propionato y butirato también pueden actuar como moléculas de señalización para *E. coli*. Por ejemplo, se ha descrito en modelos murinos que el propionato es capaz de incrementar la virulencia de EIEC asociada a la enfermedad de Crohn. Luego de cultivar EIEC con propionato como única fuente de carbono, se identificó una regulación positiva de los genes de virulencia implicados en la formación de biopelículas, la respuesta al estrés, metabolismo, integridad de membrana y la utilización de fuentes de carbono

alternativas (Ormsby y cols., 2020). Estos antecedentes revelan el papel controversial de los SCFA en el desarrollo de enfermedades diarreicas, por lo que en futuras investigaciones es necesario esclarecer de mejor manera el rol que tendrían los SCFA en la diarrea.

Al evaluar si existía una diferencia significativa entre los niveles de SCFA dependiente del patotipo ECD presente en la muestra, que incluía STEC, ETEC, EPEC y EAEC, se encontró que solamente acetato estaba aumentado de forma significativa en STEC, ETEC y EPEC a comparación de las muestras negativas para ECD (Fig.7). Sin embargo, el número de muestra de cada patotipo es muy pequeña para ser representativa de cada uno, por esta razón, sería ideal que en futuras investigaciones se evaluaran los niveles de SCFA en cada patotipo ECD con un número de muestras adecuado, y de este modo descifrar la importancia de acetato en los patotipos ECD.

En los últimos años varios estudios epidemiológicos, fisiológicos y ómicos, complementados con estudios celulares y experimentos en animales, han indicado la indudable influencia ambiental sobre la salud humana y el riesgo de desarrollar enfermedades mediadas por las comunidades microbianas presentes en el intestino humano. La microbiota incluye una gran variedad de bacterias, arqueas, bacteriófagos, virus y hongos que interactúan y coexisten con los humanos, siendo la mayoría de ellos comensales o mutualistas. Sin embargo, muchas veces en un proceso infeccioso se genera disbiosis de la microbiota lo que da paso al desarrollo de una enfermedad diarreica (Baumler y Sperandio 2016; Li y cols., 2021). En este trabajo se pudo demostrar que las muestras de deposición de niños menores de 5 años, positivas para alguno de los patotipos ECD, poseían una composición de la microbiota distintiva a la encontrada en niños sanos (Fig.10), lo cual ha sido descrito previamente en nuestro laboratorio (Gallardo y cols., 2017; Gallardo y cols., 2020). Sin embargo, la composición de la microbiota cambia enormemente durante los primeros 5 años de vida, generando que exista una gran diferencia entre niños de 1-3 años y niños de 3-5 años (Derrien y cols., 2019). Por esta razón, se evaluó estos rangos etarios en el análisis de composición de la microbiota obtenida en este

trabajo, encontrando que no existen agrupaciones por edades tanto para el grupo ECD como para el grupo control (Fig.10). Por lo tanto, la composición de la microbiota de las muestras de este estudio no se distribuye en función de la edad de los individuos. El enfoque metodológico empleado se basó en la comparación de la composición de *amplicon sequence variants* (ASVs) encontrados en ambos grupos de muestra. La utilización de ASVs sobre otras asignaciones taxonómicas como *Operational Taxonomic Units* (OTUs) y *Operational Phylogenetic Units* (OPUs) resultó en una asignación de taxones más confiable y proporcionando datos taxonómicos más claros. Esto ocurre principalmente debido a que, a diferencia de los OTUs, la asignación de ASVs no impone los umbrales de disimilitud arbitrarios, si no que infiere las secuencias biológicas en las muestras antes de la introducción de errores de amplificación y secuenciación, distinguiendo las variaciones de las secuencias en tan solo un nucleótido (Callahan y cols., 2017).

En cuanto a la composición de la microbiota, se tiene antecedentes que los recién nacidos poseen una microbiota intestinal muy diversa durante los primeros meses de vida, siendo múltiples los factores que afectan su desarrollo, como las condiciones higiénicas durante el parto, el tipo de parto, la edad gestacional, la hospitalización del lactante, la alimentación del lactante, entre otros. A medida que se aumenta de edad, las comunidades microbianas se vuelven cada vez más similares convergiendo hacia un perfil genérico similar al adulto, caracterizado por una predominancia de Bacteroidetes y Firmicutes. A lo largo de la edad adulta, la composición de la microbiota intestinal es relativamente estable, y solo sufre alteraciones transitorias por factores determinados (Mariat y cols., 2009; Power y cols., 2014). Se ha descrito previamente que niños hospitalizados que padecen episodios diarreicos presentan un cambio en la composición de su microbiota, con un aumento en la abundancia del filo Proteobacteria y una disminución de la razón Firmicutes/Bacteroidetes en comparación de niños sanos (Braun y cols., 2017). En otro estudio se encontró que las Proteobacterias aumentan en respuesta a la diarrea osmótica, además de la existencia de una disminución significativa en las poblaciones de Bacteroidetes y Firmicutes, especulando que las Proteobacterias tienen la capacidad de colonizar y repoblar nichos empobrecidos durante los

episodios de diarrea de manera más eficiente que otras bacterias (Gorkiewicz y cols., 2013). Nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito anteriormente, ya que se encontró que la microbiota presente en infecciones ECD tiene una mayor proporción del filo Proteobacteria y una disminución de Bacteroidetes a comparación de los niños sanos (Fig.8). A pesar que se observó una tendencia a disminuir del filo Firmicutes en ECD, este no llegó a ser significativo ( $p=0,06$ ). A nivel de familia, se observó un aumento en la proporción de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Fig.9). Lo anterior, también es concordante con investigaciones previas en animales, puesto que se ha evidenciado que la diarrea en terneros es acompañada de una disbiosis, donde se destaca una mayor abundancia de *Enterobacteriaceae* en comparación de terneros sanos (Whon y cols., 2021). Además, en la familia *Enterobacteriaceae* están los principales agentes etiológicos de infecciones gastrointestinales, ya que alberga más de 70 géneros de bacterias, muchos de ellos patógenos clínicamente significativos como la misma *E. coli*, especies de *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y especies de *Enterobacter* (Jamil, 2014). Por otro lado, se encontró una disminución de las familias *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* y *Lachnospiraceae* en ECD a comparación del grupo control (Fig.9). Estudios metatranscriptómicos han demostrado que las familias *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae* y *Ruminococcaceae* representan a las familias más predominantes detectadas en una microbiota sana. Las familias *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* han sido descritas como degradadores de pectina y celulosa, por lo tanto, cumplen un papel importante en el metabolismo de fibras dietéticas. Por su parte, *Bacteroidaceae* está involucrada en casi todas las categorías funcionales de la microbiota, como la motilidad celular, biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo. Mientras que *Ruminococcaceae* se asoció principalmente con la biosíntesis de antibióticos, lo cual es importante en la defensa del hospedero contra patógenos (Gosalbes y cols, 2011). Por lo tanto, la disminución de estas 3 familias en ECD se relaciona con la disrupción de una microbiota sana, y por consecuencia con la pérdida normal de sus funciones.

Teniendo en cuenta que existen niveles de SCFA significativamente elevados en los niños con diarrea positivos para ECD, en conjunto con la identificación de una microbiota distintiva en estos niños en comparación con niños sanos, se propuso determinar los principales géneros de bacterias productoras de SCFA descritos en la literatura en ambos grupos de muestra, y si existe una diferencia significativa entre ellos. Se observó un aumento de los géneros de bacterias productoras de SCFA *Veillonella* y *Streptococcus* en el grupo ECD a comparación del grupo control (Fig.11), lo cual se podría asociar con los niveles aumentados de SCFA encontrados (Fig 6). Esto concuerda con observaciones previas que han descrito que bacterias pertenecientes al género *Veillonella* son capaces de fermentar el ácido láctico a propionato y acetato por la vía metilmalonil-CoA (Distler y Kröncke, 1981). En investigaciones recientes se ha sugerido que el género *Veillonella* sería el responsable de mediar las relaciones entre la microbiota intestinal y la capacidad de ejercicio, ya que se ha identificado un enriquecimiento del género *Veillonella* en la microbiota intestinal de corredores de maratón. Esto se relaciona principalmente con el lactato, un producto del metabolismo celular que tiende acumularse en los músculos cuando las células carecen de suficiente oxígeno. El lactato cuando está acumulado puede alimentar a las bacterias del género *Veillonella*, lo que produce mejoras en la resistencia física (Frampton y cols., 2020). En cuanto a infecciones diarreicas, en un estudio en cerdos con diarrea se evidenció que el género *Veillonella* aumentaba a comparación a cerdos sanos, principalmente asociándose a la disbiosis inducida por el virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV). En particular, hubo un aumento notable de *Fusobacterium* y *Veillonella* en relación con la edad de lechones con diarrea, lo que llevó a concluir que la infección PEDV causa graves perturbaciones en la microbiota intestinal porcina (Huang y cols., 2019).

Al igual *Veillonella*, el género *Streptococcus* normalmente forma parte de la microbiota intestinal y mucosa oral de los mamíferos, no obstante, algunas especies de *Streptococcus* son capaces de producir diversas enfermedades infecciosas, como: amigdalitis, meningitis, neumonía, endocarditis y caries dentales (Spellerberg y Brandt, 2015). Se ha descrito que en el colon las bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* son capaces de producir acetato mediante la vía Wood-

Ljungdahl, ya sea por la reducción de CO<sub>2</sub> a formato o mediante la reducción de CO<sub>2</sub> a CO, que luego se combina con un grupo metilo para producir acetil-CoA (Koh y cols., 2016). Se tiene antecedentes que individuos con SCFA aumentados, obesidad y factores de riesgo de enfermedades cardiometabólicas tienen una abundancia de taxones microbianos como *Streptococcus* (Schiattarella y cols., 2018). Del mismo modo, se ha visto que *Streptococcus* es numeroso en la microbiota fecal de pacientes con SII (Kassinen y cols., 2007). En el contexto de enfermedades diarreicas, en un estudio de 2013 se evidenció que niños con diarrea de etiología desconocida al momento de admisión en el hospital, tenían *Streptococcus* como el género bacteriano fecal más dominante (Jin y cols., 2013). En otro estudio realizado en niños de Bangladesh hospitalizados con diarrea bacteriana aguda, se identificó que el diagnóstico más frecuente de diarrea correspondía a ETEC. Sin embargo, la microbiota de las heces se caracterizaba por un crecimiento excesivo de *Streptococcus* durante la fase aguda de la diarrea, específicamente de las especies *Streptococcus gallolyticus* y *Streptococcus salivarius*. Aun así, no se detectaron genes de virulencia relevantes para el desarrollo de diarrea en los genomas secuenciados de *Streptococcus* aislados de los pacientes. Por lo tanto, se propuso que el mecanismo por el cual aumenta *Streptococcus* durante la diarrea probablemente sea una consecuencia indirecta de la presencia de *E. coli*, ya que los *Streptococcus* fecales al ser fermentadores eficientes de carbohidratos simples y de rápido crecimiento, posiblemente experimenten un crecimiento excesivo cuando las bacterias intestinales competidoras se eliminan del intestino por el aumento de peristalsis que sufren los individuos con diarrea (Sarker y cols., 2016). A pesar de la asociación de estos dos géneros en el desarrollo de la diarrea, aún se requiere investigaciones posteriores para esclarecer la importancia de estos en las infecciones por ECD, y si por si solos son los responsables de generar los aumentos de SCFA.

Finalmente, se observó una disminución de 7 géneros de bacterias productoras de SCFA en el grupo ECD en comparación con el grupo control (Fig.12), correspondiendo a los géneros: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Dialister*, *Roseburia* y *Ruminococcus*. Estos hallazgos son contradictorios con los

altos niveles de SCFA encontrados en las muestras ECD, no obstante, muchos estudios han señalado que el género *Bacteroides* predomina en el intestino humano de individuos sanos, representando casi el 25% de la microbiota intestinal total, y colonizando el nicho intestinal para establecer una relación de simbiosis mutua con el huésped (Wang y cols., 2020). Por lo tanto, su disminución se podría relacionar a la disbiosis presente en los niños con diarrea por ECD. La disbiosis intestinal presente en la diarrea a menudo se caracteriza por una diversidad bacteriana reducida, reducción en la abundancia proporcional de anaerobios obligados, aumento de especies bacterianas anaerobios facultativos como *Enterobacteriaceae* y otros patógenos oportunistas potenciales, una alteración del moco intestinal y una respuesta inmune desregulada (Walker y Lawley, 2013). En otro estudio, se evaluó la composición de la microbiota en niños menores de 5 años con diarrea moderada a severa (DMS) y niños sanos sin diarrea en países de bajos ingresos, demostrando que la composición general de la microbiota en individuos sanos experimenta un aumento particularmente pronunciado en la abundancia proporcional del género bacteriano *Prevotella* en edades más avanzadas, donde el género *Prevotella* aumenta de aproximadamente un 12% a aproximadamente un 48% de abundancia proporcional durante los primeros 5 años de vida, mientras que el género *Escherichia* desciende de aproximadamente un 20% de abundancia en bebés menores de 6 meses de edad a aproximadamente un 1% en niños de 2 a 5 años. En contraste, en los casos de DMS la abundancia de *Prevotella* alcanza niveles muchos menores, con solo un 23% de abundancia en el grupo de mayor edad, mientras que *Escherichia/Shigella* y *Streptococcus* mantienen una alta proporción en todos los grupos de edad. Es más, pareciera que *Prevotella* y *Escherichia/Shigella* están correlacionados negativamente en los casos de DMS y en niños sanos, ya que se puede evidenciar que existe una correlación negativa entre los linajes anaeróbicos facultativos (*Escherichia/Shigella*) y los linajes anaeróbicos obligados (*Prevotella*) encontrados en este estudio (Pop y cols., 2014). Esto coincide con estudios realizados en 2013 (Walker y Lawley, 2013) que señalan la disminución de anaerobios obligados en los episodios de diarrea. Estos antecedentes en conjunto concuerdan con nuestros hallazgos, ya que el género

*Prevotella* está significativamente disminuido en los niños menores de 5 años con diarrea positiva para patógenos ECD (Fig. 12), y al mismo tiempo existe una gran abundancia de bacterias pertenecientes al género *Escherichia* en este grupo (datos no mostrados). Además, la mayoría de las bacterias pertenecientes a los géneros disminuidos en ECD corresponden a bacterias anaeróbicas obligadas.

Las especies que pertenecen al género *Blautia* también comúnmente están presentes en la microbiota intestinal de los humanos, cumpliendo un rol en el metabolismo de la glucosa, produciendo acetato, etanol, hidrógeno, lactato y succinato (Liu y cols., 2008). En humanos se ha demostrado que una disminución en la abundancia de *Blautia* es acompañada de efectos negativos para la salud del hospedero. Por ejemplo: Un mayor pronóstico negativo para el cáncer de mama en estadios tempranos, y una mayor mortalidad relacionada con la enfermedad injerto contra hospedero (EICH), la cual es una complicación frecuente después del trasplante de células madres hematopoyéticas (Luu y cols., 2017; Jenq y cols., 2015). Por otro lado, se ha descrito que bacterias pertenecientes al género *Faecalibacterium* son comensales intestinales que producen butirato, pero la creciente evidencia ha señalado la importancia de las propiedades antiinflamatorias de este género. Por esta razón, distintas investigaciones han indicado que recuentos bajos de *Faecalibacterium* se asocian con una disbiosis microbiana relacionada con un fenotipo inflamatorio, como son las enfermedades inflamatorias intestinales humanas, específicamente la enfermedad de Crohn y la colitis infecciosa (Sokol y cols., 2008, 2009). En medicina veterinaria, estudios observaron una disminución significativa de los géneros *Blautia* y *Faecalibacterium* en perros con diarrea aguda hemorrágica y no hemorrágica, sin embargo, al tratar los perros con probióticos se observó una recuperación en la abundancia de estos géneros y disminución en la gravedad de la diarrea (Ziese y cols., 2018), señalando nuevamente el rol de la disbiosis en las infecciones diarreicas.

Al igual que muchos géneros productores de SCFA, el género *Roseburia* está formado principalmente por bacterias anaerobias obligadas, y se encarga de metabolizar los componentes de la dieta a SCFA, especialmente a butirato. La

alteración en los niveles de *Roseburia* está asociado con varias enfermedades: como SII, obesidad, diabetes tipo 2, afecciones del sistema nervioso y alergias (Tamanai-Shacoori, 2017). Un estudio realizado en 2017 que evaluó el efecto de un probiótico versus un antibiótico sobre la microbiota de individuos sanos, evidenció que los principales géneros de una microbiota sana correspondían a *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia* y *Ruminococcus*. Pero al momento de administrar el antibiótico la prevalencia de *Roseburia* disminuyó significativamente, lo cual fue acompañada de un crecimiento excesivo de *Escherichia* y de diarrea asociada a antibióticos. Cuando se administró el probiótico en conjunto con el antibiótico, no solamente se redujo los cambios inducidos en la microbiota, si no que se redujo el crecimiento de *Escherichia* y se evitó la diarrea asociada a antibióticos, demostrando nuevamente la importancia de la disbiosis en el desarrollo de diarrea (Kabbani y cols., 2017). El género *Ruminococcus* por su parte se encuentra comúnmente en el rumen de los animales, sin embargo, también está presente en animales no rumiantes como los seres humanos. *Ruminococcus* es muy importante para degradar la celulosa de la dieta en SCFA, y al estar constantemente presentes en el intestino humano sano, se sugieren posibles roles en el mantenimiento de la microbiota intestinal humana (Park, 2018). Por lo que su disminución se asocia con la disrupción de una microbiota sana en los episodios de diarrea.

Si bien se encontró ciertos géneros de bacterias productoras de SCFA aumentados en el grupo ECD en comparación con el grupo control, es necesario emplear un análisis de correlación para evidenciar si los niveles de SCFA encontrados se asocian con microorganismos productores de SCFA tanto en el grupo ECD como en el grupo control. En este estudio se observó que a pesar de encontrar los géneros de bacterias *Veillonella* y *Streptococcus* aumentados en el grupo ECD (Fig.11), no se reflejó en una correlación positiva de ambos géneros con la producción de ningún SCFA en el grupo ECD (Fig.13). Por lo contrario, el género *Coprococcus* se correlacionó de forma positiva con la producción de propionato y butirato, y el género *Blautia* con la producción de acetato en el grupo ECD, siendo que *Coprococcus* no evidenciaba un aumento significativo y *Blautia* estaba disminuido en este grupo (Fig.12). El género *Coprococcus*, el cual es un gran

productor de propionato y butirato en el intestino humano, se ha observado aumentado en niños con sobrepeso, así como un aumento en las concentraciones de propionato en las heces de estos niños (Murugesan y cols., 2015). Además, el género *Coprococcus* también se ha visto asociado con el uso de prebióticos. Un estudio que evaluó el uso de ácido graso omega-3, resultó en aumentos significativos de los géneros *Coprococcus* y *Bacteroides*, y aumentos significativos de los SCFA isobutirato, isovalerato y butirato. Lo interesante, es que al realizar un análisis de correlación se halló que la abundancia relativa de *Coprococcus* estaba correlacionado positivamente con la producción de isobutirato y butirato (Vijay y cols., 2021). En otro estudio, se observó que la ingesta de probióticos inducía un aumento de *Coprococcus*, mientras que el género *Blautia* disminuía. Curiosamente, los géneros *Coprococcus* y *Blautia* pertenecen a la familia *Lachnospiraceae*, y junto con el género *Clostridium* forman parte del orden Clostridiales, el cual incluye diversas bacterias polisacarolíticas que contribuyen fuertemente a la producción de SCFA en el intestino de individuos sanos. La familia *Lachnospiraceae* se identificó como los componentes microbianos más activos en el ambiente intestinal de adultos sanos, y particularmente se evidenció que el tratamiento con probióticos redistribuye los taxones microbianos de la familia *Lachnospiraceae*, afectando principalmente la relación *Blautia/Coprococcus* (Ferrario y cols., 2014). Esto concuerda con ciertos hallazgos de nuestra investigación, ya que existe una disminución tanto del género *Blautia* como de la familia *Lachnospiraceae* en el grupo ECD, por lo que, al igual que los probióticos la diarrea tiene un impacto en la composición normal de la microbiota intestinal. Sin embargo, en vez de evidenciar un aumento de *Coprococcus* en el grupo ECD, se observó a los géneros *Veillonella* y *Streptococcus* aumentados, los cuales no se correlacionaron con la producción de ningún SCFA estudiado. Por lo tanto, se puede concluir que una mayor producción de SCFA en niños con diarrea positivos para ECD no se vincula directamente con el aumento o disminución de los géneros de bacterias productores de SCFA, si no que más bien se correlaciona con la presencia de géneros específicos, siendo *Coprococcus* y *Blautia* los principales encontrados, y los que parecieran ser los responsables de la producción de acetato, propionato y butirato.

Los géneros *Faecalibacterium* y *Roseburia* mostraron una correlación positiva en la producción de butirato, tanto en el grupo ECD como en el grupo control (Fig.13), siendo que ambos géneros estaban disminuidos significativamente en el grupo ECD (Fig.12). Estos hallazgos nuevamente indicarían que la disminución o aumento de los géneros productores de SCFA no tiene una relación directa con la producción de SCFA. No obstante, es necesario considerar las vías metabólicas en la producción de SCFA, ya que tal vez exista la presencia de un factor que estimule la producción de SCFA a nivel metabólico, sin afectar la abundancia a nivel de géneros de los microorganismos productores de SCFA. Uno de los principales SCFA, el acetato, puede ser producido a partir del piruvato por distintas bacterias intestinales, ya sea a través de acetil-CoA o mediante la vía Wood-Ljungdahl. Otro SCFA importante, el propionato, se produce a partir de la conversión de succinato en metilmalonil-CoA a través de la ruta del succinato, propionato también puede ser sintetizado a partir de acrilato con lactato como precursor a través de la vía del acrilato, o mediante la vía del propanodiol. El tercer SCFA principal, el butirato, se produce a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA y la posterior reducción a butiril-CoA, el cual se convierte en butirato a través de la vía clásica, mediante fosfotransbutirilasa y butirato quinasa, o a través de la ruta butiril-CoA, mediante acetato CoA-transferasa (Koh y cols., 2013). Por lo que, un aumento en la producción de intermediarios, como el mismo succinato y lactato, pueden ocurrir durante los episodios de diarrea y ser los responsables del aumento en la producción de SCFA encontrado. Por otro lado, el aumento en la actividad enzimática también puede ser responsable del aumento de SCFA encontrado, ya que las propiedades de las enzimas que limitan la velocidad en los pasos metabólicos es de gran importancia para comprender la divergencia metabólica de las diferentes bacterias productoras de SCFA contenidas en la microbiota intestinal (Xu y cols., 2020).

Por último, el único género que mostró una marcada correlación negativa con la producción de acetato y propionato en el grupo control fue *Bacteroides* (Fig.13), lo cual nos indica que la producción de ambos SCFA en los niños sanos no estaría vinculado a este género bacteriano.

A pesar del claro aumento de SCFA en los niños con diarrea, aún es necesario descifrar el rol que cumplen estos en el desarrollo de la diarrea, ya que podrían desempeñarse como moléculas de señalización para el proceso infeccioso o simplemente intentar aplacar la pérdida de líquidos que ocurre durante la diarrea. Además, debido a que no hay una correlación positiva entre los niveles de SCFA y los géneros de bacterias productoras de SCFA aumentados en el grupo ECD, es necesario esclarecer si existe otro mecanismo como el responsable del aumento de SCFA o si géneros en específicos, en este caso *Coprococcus* y *Blautia*, sean los responsables de su producción independientemente de la abundancia que estos presenten en los niños con diarrea.

Nuestro estudio tiene limitaciones. Las concentraciones de SCFA se midieron en muestras de deposición y no en colon, por lo que los datos obtenidos son una interpretación de lo que ocurre en el colon. Además, desconocemos la información de la dieta en ambos grupos de estudio, sabiendo que las concentraciones de SCFA son influenciadas por la dieta ingerida, e ignoramos si la microbiota que logramos identificar es consecuencia de la infección o es causante del proceso infeccioso, ya que desconocemos en qué etapa de diarrea estaban los niños infectados por ECD.

Finalmente, nuestros resultados apoyan la hipótesis que existe niveles de SCFA aumentados en niños con diarrea por cepas de *E. coli* diarreogénicas. Siendo este aumento atribuible a géneros de bacterias productoras de SCFA contenidos en la microbiota intestinal de estos individuos. Estos hallazgos son importantes en el ámbito clínico, puesto que en un futuro cercano los niveles de SCFA podrían utilizarse como marcadores de diagnóstico para las infecciones por *E. coli* diarreogénicas y/o relacionarlos con la gravedad de las infecciones diarreicas.

## 6 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de esta tesis, se puede concluir que:

- 1) Existen niveles aumentados de acetato, propionato y butirato en deposiciones de niños con diarrea positivos para patógenos *E. coli* diarreogénicas a comparación de deposiciones de niños sanos.
- 2) Existe una alteración de la microbiota intestinal en las infecciones por cepas de *E. coli* diarreogénicas, generando una microbiota característica que es significativamente diferente de la microbiota encontrada en niños sanos. Además, el aumento de los niveles de acetato, propionato y butirato se correlacionan con específicos géneros de bacterias productoras de SCFA en la microbiota de niños con diarrea por ECD.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

Baldi, F., Bianco, M. A., Nardone, G., Pilotto, A., & Zamparo, E. (2009). Focus on acute diarrhoeal disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(27), 3341.

Baumler AJ, Sperandio V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535: 85-93.

Beebe, K., Sampey, B., Watkins, S. M., Milburn, M., & Eckhart, A. D. (2014). Understanding the apothecaries within: the necessity of a systematic approach for defining the chemical output of the human microbiome. *Clinical and Translational Science*, 7(1), 74-81.

Berthon, B.S., Macdonald-Wicks, L.K., Gibson, P.G., and Wood, L.G. (2013). Investigation of the association between dietary intake, disease severity and airway inflammation in asthma. *Respirology* 18, 447–454.

Bétis, F., Brest, P., Hofman, V., Guignot, J., Bernet-Camard, M. F., Rossi, B., ... & Hofman, P. (2003). The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen-activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infection and immunity*, 71(3), 1068-1074.

Binder, H. J. (2010). *Role of Colonic Short-Chain Fatty Acid Transport in Diarrhea. Annual Review of Physiology*, 72(1), 297–313.

Braun, T., Di Segni, A., BenShoshan, M., Asaf, R., Squires, J. E., Barhom, S. F., ... & Haberman, Y. (2017). Fecal microbial characterization of hospitalized patients with suspected infectious diarrhea shows significant dysbiosis. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.

Bushell, F., Herbert, J. M., Sannasiddappa, T. H., Warren, D., Turner, A. K., Falciani, F., & Lund, P. A. (2021). Mapping the Transcriptional and Fitness Landscapes of a Pathogenic *E. coli* Strain: The Effects of Organic Acid Stress under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Genes*, 12(1), 53.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11(12), 2639-2643.

Canani, R. B., Terrin, G., Cirillo, P., Castaldo, G., Salvatore, F., Cardillo, G., ... & Troncone, R. (2004). Butyrate as an effective treatment of congenital chloride diarrhea. *Gastroenterology*, 127(2), 630-634.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822-880.

Curtis, M. M., Hu, Z., Klimko, C., Narayanan, S., Deberardinis, R., and Sperandio, V. (2014). The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. *Cell Host Microbe* 16, 759–769.

De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2013). Development of a HPLC–UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria

during in vitro fermentation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 80, 107-115.

Derrien, M., Alvarez, A. S., & de Vos, W. M. (2019). The gut microbiota in the first decade of life. *Trends in microbiology*, 27(12), 997-1010.

Distler, W., & Kröncke, A. (1981). The lactate metabolism of the oral bacterium *Veillonella* from human saliva. *Archives of oral biology*, 26(8), 657-661.

Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodriguez, L., Soto, M., Aguilera, M., Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Guía técnica del Instituto de Salud Pública, Santiago de Chile.

Farfan MJ, Piemonte P, Labra Y, Henriquez J, Candia E, Torres JP. (2016). Panel Filmarray GI® en la detección de patógenos entéricos en deposiciones: experiencia preliminar. *Rev Chilena Infectología*,33:3.

Farfan, M. J., & Torres, A. G. (2012). Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infection and immunity*, 80(3), 903-913.

Ferrario, C., Taverniti, V., Milani, C., Fiore, W., Laureati, M., De Noni, I., ... & Guglielmetti, S. (2014). Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *The Journal of nutrition*, 144(11), 1787-1796.

Frampton, J., Murphy, K. G., Frost, G., & Chambers, E. S. (2020). *Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function*. *Nature Metabolism*, 2(9), 840–848.

Gallardo, P., Izquierdo, M., Vidal, R. M., Chamorro-Veloso, N., Rosselló-Móra, R., O’Ryan, M., & Farfán, M. J. (2017). Distinctive gut microbiota is associated with diarrheagenic *Escherichia coli* infections in Chilean children. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 424.

Gallardo, P., Izquierdo, M., Vidal, R. M., Soto, F., Ossa, J. C., & Farfan, M. J. (2020). Gut microbiota-metabolome changes in children with diarrhea by diarrheagenic *E. coli*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10.

Gosalbes, M. J., Durbán, A., Pignatelli, M., Abellan, J. J., Jiménez-Hernández, N., Pérez-Cobas, A. E., et al. (2011). Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS ONE* 6:e17447.

Gorkiewicz, G., Thallinger, G. G., Trajanoski, S., Lackner, S., Stocker, G., Hinterleitner, T., ... & Högenauer, C. (2013). Alterations in the colonic microbiota in response to osmotic diarrhea. *PloS one*, 8(2), e55817.

Hammer, H. F., Fine, K. D., Santa Ana, C. A., Porter, J. L., Schiller, L. R., & Fordtran, J. S. (1990). Carbohydrate malabsorption. Its measurement and its contribution to diarrhea. *The Journal of clinical investigation*, 86(6), 1936-1944.

Harrington, S. M., Strauman, M. C., Abe, C. M., & Nataro, J. P. (2005). Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*, 7(11), 1565-1578

Huang, A., Cai, R., Wang, Q., Shi, L., Li, C., & Yan, H. (2019). Dynamic change of gut microbiota during porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling piglets. *Frontiers in microbiology*, 10, 322.

Jamil, B. (2014). Enterobacteriaceae: At the verge of treatment. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 9(4), 1736.

Jenq, R. R., Taur, Y., Devlin, S. M., Ponce, D. M., Goldberg, J. D., Ahr, K. F., ... & van den Brink, M. R. (2015). Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(8), 1373-1383.

Jin, D., Chen, C., Li, L., Lu, S., Li, Z., Zhou, Z., ... & Xu, J. (2013). Dynamics of fecal microbial communities in children with diarrhea of unknown etiology and genomic analysis of associated *Streptococcus lutetiensis*. *BMC microbiology*, 13(1), 1-12.+

Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Mäkiyuokko, H., Rinttilä, T., Paulin, L., Corander, J., ... & Palva, A. (2007). The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*, 133(1), 24-33.

Kabbani, T. A., Pallav, K., Dowd, S. E., Villafuerte-Galvez, J., Vanga, R. R., Castillo, N. E., ... & Kelly, C. P. (2017). Prospective randomized controlled study on the effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and amoxicillin-clavulanate or the combination on the gut microbiota of healthy volunteers. *Gut Microbes*, 8(1), 17-32.

Khan, M. A., Kang, J., & Steiner, T. S. (2004). Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology*, 112(4), 651-660

Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Kuffa, P., & Kamada, N. (2016). Regulation of virulence: the rise and fall of gastrointestinal pathogens. *Journal of gastroenterology*, 51(3), 195-205.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332-1345.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder W, Nasrin D, Farag T. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382(9888):209–222

Kotloff, K. L., Nasrin, D., Blackwelder, W. C., Wu, Y., Farag, T., Panchalingham, S., ... & Saha, D. (2019). The incidence, aetiology, and adverse clinical consequences of less severe diarrhoeal episodes among infants and children residing in low-income and middle-income countries: a 12-month case-control study as a follow-on to the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *The Lancet Global health*, 7(5), e568-e584.

- La Cuesta-Zuluaga, D., Mueller, N. T., Álvarez-Quintero, R., Velásquez-Mejía, E. P., Sierra, J. A., Corrales-Agudelo, V., ... & Escobar, J. S. (2019). Higher fecal short-chain fatty acid levels are associated with gut microbiome dysbiosis, obesity, hypertension and cardiometabolic disease risk factors. *Nutrients*, 11(1), 51.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M., and Altier, C. (2002) Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* 46: 1451-1464.
- Le Bouguéneq, C., & Servin, A. L. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS microbiology letters*, 256(2), 185-194.
- Li, Y., Xia, S., Jiang, X., Feng, C., Gong, S., Ma, J., ... & Yin, Y. (2021). Gut microbiota and diarrhea: an updated review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.
- Lindsay, B., Oundo, J., Hossain, M. A., Antonio, M., Tamboura, B., Walker, A. W., ... & Das, S. K. (2015). Microbiota that affect risk for shigellosis in children in low-income countries. *Emerging infectious diseases*, 21(2), 242.countries. *Emerging Infect. Dis.* 21, 242–250. doi: 10.3201/eid2101.140795
- Liu, C., Finegold, S. M., Song, Y., & Lawson, P. A. (2008). Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(8), 1896-1902.
- Liu, C. S., Liang, X., Wei, X. H., Jin, Z., Chen, F. L., Tang, Q. F., & Tan, X. M. (2019). Gegen Qinlian decoction treats diarrhea in piglets by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids. *Frontiers in microbiology*, 10, 825.
- Luu, T. H., Michel, C., Bard, J. M., Dravet, F., Nazih, H., & Bobin-Dubigeon, C. (2017). Intestinal proportion of *Blautia* sp. is associated with clinical stage and histoprognostic grade in patients with early-stage breast cancer. *Nutrition and cancer*, 69(2), 267-275..
- Maier, L., Vyas, R., Cordova, C.D., Lindsay, H., Schmidt, T.S.B., Brugiroux, S., et al. (2013) Microbiota-derived hydrogen fuels *Salmonella Typhimurium* invasion of the gut ecosystem. *Cell Host Microbe* 14: 641-651
- Maier, R.J. (2003) Availability and use of molecular hydrogen as an energy substrate for *Helicobacter* species. *Microbes and Infection* 5:1159-1163
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). *The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease*. *Cell Host & Microbe*, 23(6), 705–715.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V. D., Sokol, H., Doré, J., ... & Furet, J. P. (2009). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, 9(1), 1-6.

Minamoto, Y., Minamoto, T., Isaiah, A., Sattasathuchana, P., Buono, A., Rangachari, V. R., ... & Suchodolski, J. S. (2019). Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *Journal of veterinary internal medicine*, 33(4), 1608-1618.

Murugesan, S., Ulloa-Martínez, M., Martínez-Rojano, H., Galván-Rodríguez, F. M., Miranda-Brito, C., Romano, M. C., ... & García-Mena, J. (2015). Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(7), 1337-1346.

Nakanishi, N., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Sugimoto, N., & Tobe, T. (2009). Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155(2), 521-530.

Nelson, A. M., Walk, S. T., Taube, S., Taniuchi, M., Hout, E. R., Wobus, C. E., & Young, V. B. (2012). Disruption of the Human Gut Microbiota following Norovirus Infection. *PLoS ONE*, 7(10), e48224.

O'Ryan, M., Prado, V., and Pickering, L.K. (2005). A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 16 (2): 125–136

Ormsby, M. J., Johnson, S. A., Carpena, N., Meikle, L. M., Goldstone, R. J., McIntosh, A., ... & Wall, D. M. (2020). Propionic acid promotes the virulent phenotype of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Cell reports*, 30(7), 2297-2305.

Park, W. (2018). Gut microbiomes and their metabolites shape human and animal health. *Journal of Microbiology*, 56(3), 151–153.

Pop, M., Walker, A. W., Paulson, J., Lindsay, B., Antonio, M., Hossain, M. A., ... & Stine, O. C. (2014). Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition. *Genome biology*, 15(6), 1-12.

Poulain, C., Galeno, H., Loayza, S., Vergara, N., Valdivieso, F., Coria, P., ... & Farfán, M. J. (2021). Detección molecular de patógenos entéricos en niños con diarrea en un hospital centinela de vigilancia de rotavirus en Chile. *Revista chilena de infectología*, 38(1), 54-60.

Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., & Fitzgerald, G. F. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*, 111(3), 387-402.

Press, W. (2014). World Health Statistics. Geneva.

Sanchez-Villamil, J., & Navarro-Garcia, F. (2015). Role of virulence factors on host inflammatory response induced by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Future Microbiology*, 10(6), 1009–1033.

Sandvig, K. (2001). Shiga toxins. *Toxicon*, 39(11), 1629–1635.

Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., ... & Brüssow, H. (2016). Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh. *EBioMedicine*, 4, 124-137.

Schiattarella, G. G., Sannino, A., Esposito, G., & Perrino, C. (2018). Diagnostics and therapeutic implications of gut microbiota alterations in cardiometabolic diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine*.

- Schiller, L. R. (2000). *DIARRHEA. Medical Clinics of North America*, 84(5), 1259–1274.
- Selendy, J. M. (Ed.). (2019). *Water and Sanitation-related Diseases and the Changing Environment: Challenges, Interventions, and Preventive Measures*. John Wiley & Sons.
- Spellerberg, B., & Brandt, C. (2015). Streptococcus. *Manual of clinical microbiology*, 383-402.
- Singh, P., Teal, T. K., Marsh, T. L., Tiedje, J. M., Mosci, R., Jernigan, K., ... Manning, S. D. (2015). *Intestinal microbial communities associated with acute enteric infections and disease recovery. Microbiome*, 3(1).
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J. J., ... & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16731-16736.
- Sokol, H., Seksik, P., Furet, J. P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., ... & Doré, J. (2009). Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases*, 15(8), 1183-1189.
- Spellerberg, B., & Brandt, C. (2015). Streptococcus. *Manual of clinical microbiology*, 383-402.
- Sun, Q., Jia, Q., Song, L., & Duan, L. (2019). Alterations in fecal short-chain fatty acids in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 98(7).
- Sun, Y., & O’Riordan, M. X. D. (2013). *Regulation of Bacterial Pathogenesis by Intestinal Short-Chain Fatty Acids. Advances in Applied Microbiology*, 93–118.
- Takao, M., Yen, H., & Tobe, T. (2014). *LeuO enhances butyrate- induced virulence expression through a positive regulatory loop in enterohaemorrhagic E scherichia coli. Molecular microbiology*, 93(6), 1302-1313.
- Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., ... & Jolivet-Gougeon, A. (2017). Roseburia spp.: a marker of health?. *Future microbiology*, 12(2), 157-170.
- Tobe, T., Nakanishi, N., and Sugimoto, N. (2011) *Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic Escherichia coli . Infect Immun* 79: 1016–1024.
- Ud-Din, Abu, & Wahid, Syeda. (2014). Relationship among Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and their differentiation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1131-1138
- UNICEF, *Committing to child Survival: A promise renewed- Progress report 2013* UNICEF, New York, 2013.

- Vidal, Jorge E., Canizález-Román, Adrián, Gutiérrez-Jiménez, Javier, & Navarro-García, Fernando. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376-386
- Vijay, A., Astbury, S., Le Roy, C., Spector, T. D., & Valdes, A. M. (2021). The prebiotic effects of omega-3 fatty acid supplementation: a six-week randomised intervention trial. *Gut microbes*, 13(1), 1-11
- Vogt, S. L., Peña-Díaz, J., & Finlay, B. B. (2015). *Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens*. *Anaerobe*, 34, 106–115.
- Wang, C., Zhao, J., Zhang, H., Lee, Y.-K., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). *Roles of intestinal bacteroides in human health and diseases*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–19.
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Carter, A., ... & Coggeshall, M. (2016). *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. *The lancet*, 388(10053), 1459-1544..
- Walker, A. W., & Lawley, T. D. (2013). Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacological research*, 69(1), 75-86.
- Wei, T., and Simko, V. (2017). R Package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix. Available online at: <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- Whelan, K., Judd, P. A., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Preedy, V. R., & Taylor, M. A. (2009). Fecal microbiota in patients receiving enteral feeding are highly variable and may be altered in those who develop diarrhea. *The American journal of clinical nutrition*, 89(1), 240-247.
- Whon, T. W., Kim, H. S., Shin, N. R., Sung, H., Kim, M. S., Kim, J. Y., ... & Bae, J. W. (2021). Calf Diarrhea Caused by Prolonged Expansion of Autochthonous Gut Enterobacteriaceae and Their Lytic Bacteriophages. *Msystems*, 6(2), e00816-20.
- Wolfe, A.J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 12–50.
- Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A., & Jenkins, D. J. A. (2006). *Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 235–243.
- Yang, L., Zhang, Q., Huang, J., Liu, D., Lan, Y., Yuan, L., & Chen, Q. (2021). Xianglian Pill ameliorates antibiotic-associated diarrhea by restoring intestinal microbiota and attenuating mucosal damage. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 113377.
- Yoo, J. Y., Groer, M., Dutra, S. V. O., Sarkar, A., & McSkimming, D. I. (2020). Gut microbiota and immune system interactions. *Microorganisms*, 8(10), 1587.
- Zhou, X., Girón, J. A., Torres, A. G., Crawford, J. A., Negrete, E., Vogel, S. N., & Kaper, J. B. (2003). *Flagellin of enteropathogenic Escherichia coli stimulates interleukin-8 production in T84 cells*. *Infection and immunity*, 71(4), 2120-2129

Ziese, A. L., Suchodolski, J. S., Hartmann, K., Busch, K., Anderson, A., Sarwar, F., ... & Unterer, S. (2018). Effect of probiotic treatment on the clinical course, intestinal microbiome, and toxigenic *Clostridium perfringens* in dogs with acute hemorrhagic diarrhea. *PLoS One*, 13(9), e0204691.

Xu, Y., Zhu, Y., Li, X., & Sun, B. (2020). Dynamic balancing of intestinal short-chain fatty acids: The crucial role of bacterial metabolism. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 118-130

## Acta de Aprobación

En Santiago de Chile, con fecha 10 de Agosto de 2015, el Comité de Ética de Clínica Las Condes, declara conocer el proyecto de investigación denominado **“Cambios en la microbiota asociados a infecciones por E. coli diarreogénicas”** cuyo investigador responsable es el señor Mauricio Farfán de esta clínica. Este proyecto contempla el uso de deposiciones de pacientes que se realicen el examen Filmarray Gastrointestinal en CLC. Estas deposiciones serán de-codificadas para proteger la confidencialidad de los datos del paciente y se realizará una extracción de ácidos nucleicos para determinar la microbiota intestinal a través de un servicio externo financiado por proyectos Fondecyt del investigador responsable. Paralelamente, la muestra de deposición será enviada al Programa de Microbiología de la Universidad de Chile para el aislamiento y caracterización de las cepas de E. coli diarreogénicas.

Esta documentación cumple con las normas éticas vigentes en esta institución y proporciona información clara y transparente respecto de la investigación, asegurando el derecho a privacidad en el uso de las muestras. Específicamente se hará uso anónimo de muestras que son habitualmente desechadas.

El Comité de Ética de Clínica Las Condes, es la entidad institucional responsable de velar por los derechos de los sujetos involucrados en este proyecto.

Por lo tanto, a través de este medio se pronuncia favorablemente respecto de este proyecto y suscribe esta declaración.

El Comité de Ética de la Investigación de Clínica Las Condes, está conformado por:

Lic. María Verónica Anguita McKay  
Dr. Manuel Sedano Lorca  
Dr. Armando Ortiz Pommier  
Dr. Octavio Rojas Gutiérrez  
Abog. María Angélica Sotomayor  
EU. Magdalena Castro Cruz

Teóloga – Magister en Bioética  
Médico Ginecólogo-Diplomado en Bioética  
Médico Neurocirujano – Magister en Bioética  
Médico Psiquiatra – Magister en Bioética ©  
Abogado -Experta en Bioética  
E.U. Magister © Epidemiología Clínica



**Armando Ortiz Pommier**

Presidente Comité de Ética de la Investigación  
Clínica Las Condes



*Nota: Se tuvo a la vista Protocolo de investigación respectivo y Carta de Subdirección de Investigación de Clínica Las Condes.*

CC: AOP/PAV archivo  
Dirección Médica  
Dirección Académica  
Subdirección de Investigación



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

## ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

(Documento en versión 2 corregida 28.05.2018)

Con fecha 02 de Mayo 2020, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Dra. Lucia Cifuentes O., Médico Genetista, Vicepresidente Subrogante  
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad.  
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra  
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular  
Dra. Maria Angela Delucchi Bicocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.  
Dr. Miguel O’Ryan, Médico Infectólogo  
Dra. Maria Luz Bascuñán Psicóloga PhD, Prof. Asociado  
Sra. Karima Yarmuch G., Abogada  
Srta. Javiera Cobo R., Nutricionista, Secretaria Ejecutiva

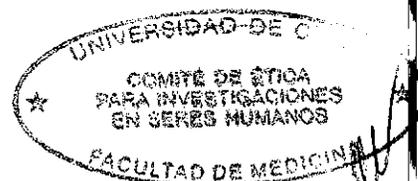
Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **“ROL DE LOS ÁCIDOS DE CADENA CORTA, PRODUCIDOS POR UNA MICROBIOTA BACTERIANA CULTIVABLE ASOCIADA LA INFECCIÓN DE E. COLI DIARREOGÉNICA EN NIÑOS, EN LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR LAS CEPAS EAEC Y STEC EN CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES”**. Cuyo investigador responsable es el Dr. Mauricio Farfan, Quien desarrolla labores en el Departamento de Pediatría y Cirugía Infantil, Campus Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto Concursable Fondecyt Regular
- Cv del Investigador y Co-investigadores
- Consentimiento Informado
- Carta Compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado este

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 29789536 - Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl)



02 MAY 2020



**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

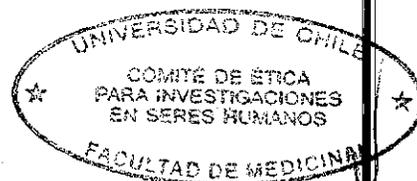
- a) Carácter de la población a estudiar (cautivo/no cautiva; investigación terapéutica/no terapéutica): Se trata de un estudio en niños menores de 5 años con infección por Escherichia coli diarreogénica.
- b) Utilidad del proyecto: Es un proyecto de alto interés y debiera generar conocimiento nuevo.
- c) Riesgos y beneficios: No tiene mayores riesgos.
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): Existe un consentimiento informado.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: No aplica.
- f) Compromiso del investigador responsable en la notificación de los resultados del estudio al finalizar el proyecto: Existe el compromiso.
- g) Requiere seguimiento Visita en terreno: Si  No  Tiempo estimado:  
Nº de vistas: 1

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó los correspondientes documentos de Consentimiento y Asentimiento Informado en su versión modificada recibida el 01 de Mayo 2020, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por este CEISH.

Sin perjuicio de lo anterior, según lo establecido en el artículo 10 bis del D.S N° 114 de 2011, del Ministerio de Salud que aprueba el reglamento de la ley N° 20.120; es preciso recordar que toda investigación científica en seres humanos deberá contar con la autorización expresa del o de los directores de los establecimientos dentro de los cuales se efectúe, la que deberá ser evacuada dentro del plazo de 20 días hábiles contados desde la evaluación conforme del CEISH, siendo de responsabilidad del investigador enviar a este Comité una copia de la misma dentro del plazo señalado.

**Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl**



02 MAY 2020



**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**

---

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de **3 años** a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

**Lugar de realización del estudio:**

- Departamento de Pediatría y Cirugía Infantil Oriente – Hospital Luis Calvo Mackenna

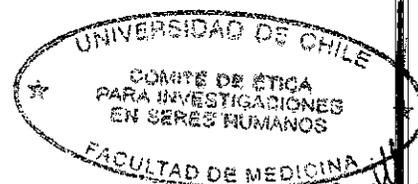
**Srta. Javiera Cobo Riveros  
Secretaria Ejecutiva CEISH**

Santiago, 02 de Mayo de 2020.

Proyecto: N° 032-2020  
Archivo acta: N° 015

---

**Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl**



02 MAY 2020

## CONSENTIMIENTO INFORMADO 1

### TÍTULO DEL PROYECTO

**“Rol de los ácidos de cadena corta, producidos por una microbiota bacteriana cultivable asociada a la infección de *E. coli* diarreogénica en niños, en la inflamación inducida por las cepas EAEC y STEC en células epiteliales intestinales”**

PATROCINANTE: Fondecyt 1200994 (Mauricio J. Farfán)

Nombre del Investigador principal: Mauricio J. Farfán

R.U.T. 13.203.009-K

Institución: Departamento de Pediatría y Cirugía Infantil, Campus Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Teléfono: +56225756103

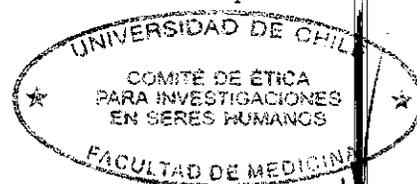
**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar de forma voluntaria a Ud. y su hijo (a) en el proyecto de investigación **“Rol de los ácidos de cadena corta, producidos por una microbiota bacteriana cultivable asociada a la infección de *E. coli* diarreogénica en niños, en la inflamación inducida por las cepas EAEC y STEC en células epiteliales intestinales”**, debido a que su hijo (a) se encuentra cursando un episodio de diarrea.

Las infecciones intestinales, como la diarrea, se producen por la acción de microorganismos dañinos, conocidos como patógenos, que dañan las células del intestino produciendo diarrea e inflamación. Estos patógenos pueden ser virus, hongos, parásitos y/o bacterias.

Las investigaciones sobre las causas de la diarrea han indicado que además de los patógenos, el ambiente en el intestino podría ser clave para que los patógenos puedan producir diarrea. Este ambiente intestinal está compuesto por microorganismos que habitan en el intestino sin producir daño, conocido como microbiota intestinal, junto con las moléculas producidas por las células del intestino o por la microbiota intestinal, conocidas como metabolitos. Al conjunto de metabolitos de un ambiente, en este caso del intestino, se le conoce como metaboloma.

En esta investigación nos enfocaremos en caracterizar el efecto de algunas moléculas de este metaboloma, conocidos como ácidos grasos de cadena corta (AGCC), en la inflamación asociada a dos patógenos que producen diarrea: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC).

**¿Por qué estudiar los AGCC?** Los AGCC son producidos por las bacterias de la microbiota intestinal y cumplen diferentes funciones en el organismo, tales como: ser fuente de energía, participar en la regulación del apetito y de la respuesta inmune, entre otras. En el último tiempo, se ha reportado que los AGCC también podrían estar regulando la virulencia de patógenos intestinales. Por este motivo, en esta investigación estudiaremos el metaboloma y la microbiota intestinal en muestras de deposición con el objetivo de dilucidar el rol de los AGCC en la inflamación producida por EAEC y STEC.



02 MAY 2020

**Objetivo:** Esta investigación tiene por objetivo determinar el rol de los AGCC, producidos por la microbiota asociada a las infecciones por *Escherichia coli* diarreogénicas en niños, en la inflamación inducida por las cepas EAEC y STEC en células intestinales. Para ello, se identificarán los microorganismos y los metabolitos presentes en las muestras de deposiciones.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar se utilizará la muestra sobrante de la deposición de su hijo (a). Para complementar el estudio se le solicitará información sobre su hijo (a) como: días de duración de la diarrea, tipo de alimentación, residencia y uso de medicamentos. Sesenta días de ocurrido el episodio diarreico, una enfermera se contactará con Ud. para consultar la evolución y recuperación de su hijo (a), junto con solicitar una nueva muestra de deposición. A las muestras obtenidas se les asignará un código para asegurar el anonimato de su hijo (a). Las muestras de deposición obtenidas durante y posterior a la diarrea se utilizarán para determinar la microbiota y el metaboloma intestinal, el aislamiento y caracterización del patógeno causante de la diarrea y estudiar el rol de la microbiota en la infección de patógenos causantes de diarrea.

**Riesgos:** En este estudio solo se requieren muestras de deposiciones sobrantes. Considerando que no se realizará otro procedimiento, no existen riesgos adicionales a los propios de la obtención de la muestra de deposición.

**Costos:** La obtención de esta muestra de deposición no tendrá costo alguno para Ud.

**Beneficios:** Este estudio no tiene beneficio para Ud. y su hijo (a). Sin embargo, este estudio significará un avance para el progreso del conocimiento y un mejor tratamiento de futuros pacientes que sufran de diarrea.

**Alternativas:** Si Ud. decide no participar en esta investigación, esto no afectará el cuidado ni tratamiento que se aplica habitualmente a su hijo(a).

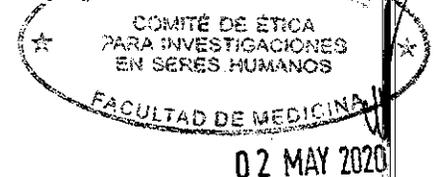
**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de la participación de su hijo (a), en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de la información solo por los investigadores. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Las muestras recolectadas y los resultados obtenidos serán utilizados solo para fines de este estudio

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándose con el investigador y con el médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de la enfermedad de su hijo(a). De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

**Complicaciones:** En el improbable caso de que su hijo(a), presente complicaciones directamente dependientes de la obtención de la muestra de deposición para este estudio, su hijo (a) recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.



**Derechos del participante:** Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Investigador: Mauricio J. Farfán (+56225756103)

Autoridad de la Institución: Hernan Sepúlveda (+56225756103)

**Otros Derechos del participante**

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

**Conclusión:**

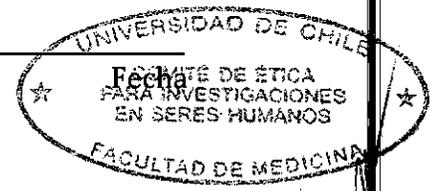
Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que mi hijo (a) participe en el proyecto "Rol de los ácidos de cadena corta, producidos por una microbiota bacteriana cultivable asociada a la infección de *E. coli* diarreogénica en niños, en la inflamación inducida por las cepas EAEC y STEC en células epiteliales intestinales".

Nombre del Sujeto: \_\_\_\_\_

_____ Nombre del padre/madre/tutor RUT:	_____ Firma	_____ Fecha
---	----------------	----------------

_____ Nombre de Director de Institución ó delegado RUT:	_____ Firma	_____ Fecha
--	----------------	----------------

_____ Nombre del Investigador RUT:	_____ Firma
--	----------------



02 MAY 2020

## CONSENTIMIENTO INFORMADO 2

### TÍTULO DEL PROYECTO

**“Rol de los ácidos de cadena corta, producidos por una microbiota bacteriana cultivable asociada a la infección de *E. coli* diarreogénica en niños, en la inflamación inducida por las cepas EAEC y STEC en células epiteliales intestinales”**

PATROCINANTE: Fondecyt 1200994 (Mauricio J. Farfán)

Nombre del Investigador principal: Mauricio J. Farfán

R.U.T. 13.203.009-K

Institución: Departamento de Pediatría y Cirugía Infantil, Campus Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Teléfono: +56225756103

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar de forma voluntaria a Ud. y su hijo (a) en el proyecto de investigación **“Rol de los ácidos de cadena corta, producidos por una microbiota bacteriana cultivable asociada a la infección de *E. coli* diarreogénica en niños, en la inflamación inducida por las cepas EAEC y STEC en células epiteliales intestinales”**, debido a que su hijo (a) se encuentra sano.

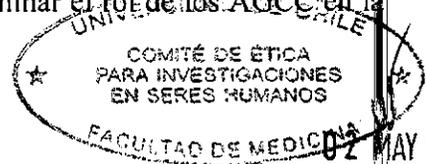
Nuestro grupo de investigación está estudiando los mecanismos involucrados en las infecciones intestinales que producen diarrea. La diarrea se produce por la acción de microorganismos dañinos, conocidos como patógenos, que dañan las células del intestino produciendo diarrea e inflamación. Estos patógenos pueden ser virus, hongos, parásitos y/o bacterias.

Las investigaciones sobre las causas de la diarrea han indicado que además de los patógenos, el ambiente en el intestino podría ser clave para que los patógenos puedan producir diarrea. Este ambiente intestinal está compuesto por microorganismos que habitan en el intestino sin producir daño, conocido como microbiota intestinal, junto con las moléculas producidas por las células del intestino o por la microbiota intestinal, conocidas como metabolitos. Al conjunto de metabolitos de un ambiente, en este caso del intestino, se le conoce como metaboloma.

En esta investigación nos enfocaremos en caracterizar el efecto de algunas moléculas de este metaboloma, conocidos como ácidos grasos de cadena corta (AGCC), en la inflamación asociada a dos patógenos que producen diarrea: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC).

**¿Por qué estudiar los AGCC?** Los AGCC son producidos por las bacterias de la microbiota intestinal y cumplen diferentes funciones en el organismo, tales como: ser fuente de energía, participar en la regulación del apetito y de la respuesta inmune, entre otras. En el último tiempo, se ha reportado que los AGCC también podrían estar regulando la virulencia de patógenos intestinales. Por este motivo, en esta investigación estudiaremos el metaboloma y la microbiota intestinal en muestras de deposición con el objetivo de dilucidar el rol de los AGCC en la inflamación producida por EAEC y STEC.

**¿Por qué necesitamos que su hijo participe en el estudio siendo que está sano?** En nuestro proyecto analizaremos muestras de niños que están con diarrea, pero es muy importante comparar los resultados con muestras de niños sanos como el de su hijo (a). Con esta información podemos determinar la microbiota y el metaboloma asociado a diarreas, y de esta forma, determinar el rol de los AGCC en la inflamación producida por patógenos.



**Objetivo:** Esta investigación tiene por objetivo determinar el rol de los AGCC, producidos por la microbiota asociada a las infecciones por *Escherichia coli* diarreogénicas en niños, en la inflamación inducida por las cepas EAEC y STEC en células intestinales. Para ello, se identificarán los microorganismos y los metabolitos presentes en las muestras de deposiciones de niños sanos y niños con diarrea.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar se utilizará una muestra sobrante de la deposición de su hijo (a). Para complementar el estudio se le solicitará información sobre su hijo (a) como: tipo de alimentación, residencia y uso de medicamentos. A las muestras obtenidas se les asignará un código para asegurar el anonimato de su hijo (a). Las muestras de deposición se utilizarán para determinar la microbiota y el metaboloma intestinal, el aislamiento y caracterización de microorganismos presentes en la muestra y estudiar el rol de la microbiota en la infección de patógenos causantes de diarrea.

**Riesgos:** En este estudio solo se requieren muestras de deposiciones sobrantes. Considerando que no se realizará otro procedimiento, no existen riesgos adicionales a los propios de la obtención de la muestra de deposición.

**Costos:** La obtención de esta muestra de deposición no tendrá costo alguno para Ud.

**Beneficios:** Este estudio no tiene beneficio para Ud. y su hijo (a). Sin embargo, este estudio significará un avance para el progreso del conocimiento y un mejor tratamiento de futuros pacientes que sufran de diarrea.

**Alternativas:** Si Ud. decide no participar en esta investigación, esto no afectará el cuidado ni tratamiento que se aplica habitualmente a su hijo(a).

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de la participación de su hijo (a), en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de la información solo por los investigadores. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Las muestras recolectadas y los resultados obtenidos serán utilizados solo para fines de este estudio

**Información adicional:** Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

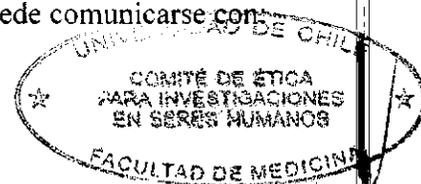
**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándose con el investigador y con el médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de la enfermedad de su hijo(a). De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

**Complicaciones:** En el improbable caso de que su hijo(a), presente complicaciones directamente dependientes de la obtención de la muestra de deposición para este estudio, su hijo (a) recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.

**Derechos del participante:** Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Investigador: Mauricio J. Farfán (+56225756103)

Autoridad de la Institución: Hernán Sepúlveda (+56225756103)



02 MAY 2020

**Otros Derechos del participante**

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del “Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos”, Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que mi hijo (a) participe en el proyecto “Rol de los ácidos de cadena corta, producidos por una microbiota bacteriana cultivable asociada la infección de *E. coli* diarreogénica en niños, en la inflamación inducida por las cepas EAEC y STEC en células epiteliales intestinales”.

Nombre del Sujeto:

---

\_\_\_\_\_  
Nombre del padre/madre/tutor  
RUT:

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre de Director de Institución  
ó delegado  
RUT:

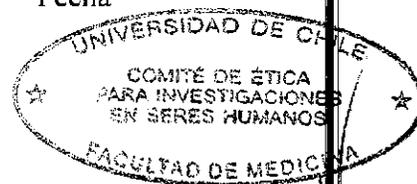
\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador  
RUT:

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha



02 MAY 2020