

## DISBIOSIS AERÓBICA Y SÍNTOMAS GASTROINTESTINALES Y CONDUCTUALES EN NIÑOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

Xiomara Moreno<sup>1</sup>, Giancarlo Santamaria<sup>2</sup>, Roger Sánchez<sup>2</sup>, Andrea Olivares<sup>2</sup>, María Fátima Garcés<sup>3</sup>, Celsy Hernández<sup>3</sup>, Ana Cecilia Márquez<sup>4</sup>, Clara Martínez<sup>5</sup>, Karolina López<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Instituto Médico la Floresta, Caracas-Venezuela. <sup>2</sup>Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela. <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela. <sup>4</sup>Unidad de Autismo Hospital-Maternidad Concepción Palacios, Caracas-Venezuela.

<sup>5</sup>Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición, Caracas-Venezuela. <sup>6</sup>Unidad de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica, Hospital General Dr. Miguel Pérez Carreño, IVSS, Caracas-Venezuela.

Recibido para publicación 2 Septiembre 2018. Aceptado 30 Septiembre 2018.

### RESUMEN:

**Introducción:** La alteración de la microbiota gastrointestinal se presenta con mayor frecuencia en niños con trastornos del espectro autista (TEA) y se ha asociado con problemas intestinales y de comportamiento. En este estudio se propone evaluar la disbiosis como una alteración de la microbiota gastrointestinal aeróbica (MGIA), y su relación con alteraciones intestinales y conductuales en niños con TEA. **Materiales y métodos:** estudio transversal y descriptivo de muestras de heces por el método de cultivo para evaluar la MGIA proveniente de 76 niños. Grupo A: 41 niños con TEA. Grupo B: 35 niños sin TEA. Se recopilaron datos epidemiológicos, clínicos, gastrointestinales y conductuales. La MGIA se evaluó bajo la presencia o no de disbiosis: Ausente, Grado I, Grado II y Grado III. **Resultados:** Grupo A: sin disbiosis 8, con disbiosis 33; Grupo B: sin disbiosis 23, con disbiosis 12;  $p=0.034$  entre los grupos en estudio. *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens* fueron los microorganismos más aislados causantes de disbiosis en el grupo con TEA. El estreñimiento fue el principal síntoma gastrointestinal en el grupo con TEA respecto al grupo control ( $p=0.041$ ). Las alteraciones neuroconductuales en niños con TEA fueron: aleteo 48,8%, autoagresión 34,1%, berrinches 63,4%, insomnio 36,6% y capacidad verbal 73,2%. No hubo significancia estadística al correlacionar la disbiosis con los síntomas gastrointestinales y conductuales en los niños con TEA. **Conclusiones:** Este estudio refleja que la disbiosis es más común en niños con TEA y el estreñimiento fue el síntoma gastrointestinal más frecuente en esta condición. No hubo relación entre la disbiosis y los demás síntomas evaluados.

**Palabras clave:** Conductas del Neurodesarrollo, Disbiosis, Microbiota, Síntomas Gastrointestinales, Trastorno del Espectro Autista.

## AEROBIC DYSBIOSIS AND GASTROINTESTINAL AND BEHAVIORAL SYMPTOMS IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER

### SUMMARY

**Introduction:** Alteration of the gastrointestinal microbiota occurs most frequently in children with autism spectrum disorders (ASD) and has been associated with intestinal and behavioral problems. In this study it is proposed to evaluate dysbiosis as an alteration of the aerobic gastrointestinal microbiota (MGIA), and its relationship with intestinal and behavioral alterations in children with ASD. **Materials and methods:** cross-sectional and descriptive study of stool samples by the culture method to evaluate MGIA from 76 children. Group A: 41 children with ASD. Group B: 35 children without ASD. Epidemiological, clinical, gastrointestinal and behavioral data were collected. MGIA was evaluated under the presence or absence of dysbiosis: Absent, Grade I, Grade II and Grade III. **Results:** Group A: without dysbiosis 8, with dysbiosis 33; Group B: without dysbiosis 23, with dysbiosis 12;  $p = 0.034$  among the groups under study. *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* were the most isolated microorganisms causing dysbiosis in the ASD group. Constipation was the main gastrointestinal symptom in the ASD group with respect to the control group ( $p = 0.041$ ). Neurobehavioral alterations in children with ASD were: flutter 48.8%, self-aggression 34.1%, tantrums 63.4%, insomnia 36.6% and verbal ability 73.2%. There was no statistical significance in correlating dysbiosis with gastrointestinal and behavioral symptoms in children with ASD. **Conclusions:** This study reflects that dysbiosis is more common in children with ASD and constipation was the most frequent gastrointestinal symptom in this condition. There was no relationship between dysbiosis and the other symptoms evaluated.

**Key words:** Neurodevelopmental Behaviors, Dysbiosis, Microbiota, Gastrointestinal Symptoms Autism Spectrum Disorder

Solicitar copia a: Xiomara Moreno Calderón, ( x.morenoc@hotmail.com; xmorenoc1356@gmail.com )

## Introducción

Debido al descubrimiento de la microbiota asociada con alteraciones en el comportamiento y la cognición en el individuo se ha podido relacionar significativamente al componente microbiota-intestino-cerebro. La influencia del intestino y la microbiota en la salud humana se estudia particularmente en pacientes con enfermedades autoinmunes y con trastornos neuropsiquiátricos, incluido el Trastorno del Espectro Autista (TEA) (1). El Autismo es un trastorno del neurodesarrollo, caracterizado por alteraciones en la interacción social, el lenguaje y un patrón restringido de los intereses y actividades a lo largo de la vida (2). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), registra que 1 de 68 niños alrededor de los 8 años son diagnosticados con TEA, estimando una incidencia de 14,7 por cada 1,000 niños en los Estados Unidos (3). Estudios recientes relacionan las alteraciones del TEA con trastornos gastrointestinales debido a factores patogénicos compartidos y mecanismos fisiopatológicos (1).

Al existir inflamación en la membrana intestinal se altera la función inmunológica, la capacidad de absorción de nutrientes en la dieta es deficiente y hay un déficit en la producción enzimática, conduciendo a una desregulación del microambiente que conforma la microbiota intestinal (MI), estableciéndose una alteración denominada disbiosis. Los microorganismos que integran la MI, son entidades microbianas que conviven en las superficies mucosas, manteniendo un equilibrio simbiótico con el hospedero en el que habitan (4-7). Algunos problemas de conducta relacionados con el neurodesarrollo en niños con TEA se han vinculado con el desequilibrio de la MI causando confusión, hiperactividad, falta de concentración, irritabilidad y agresión, así como dolor abdominal, estreñimiento, gases, entre otros (5). Estudios revelan mejoría temporal significativa de los comportamientos del neurodesarrollo, después de tratamientos antimicrobianos con vancomicina o metronidazol en niños con TEA regresivos, llamando la atención sobre posibles cambios de la MI en la patogénesis del TEA. De acuerdo a lo anteriormente expuesto, en este estudio se evalúa la disbiosis como una alteración de la microbiota intestinal aeróbica (MGIA) y su relación con síntomas gastrointestinales y conductuales en niños con TEA.

## Materiales y métodos

Estudio transversal y descriptivo basado en la recolección de datos y muestras biológicas (heces) de 76 niños, entre febrero 2015 y agosto 2016. Este estudio contó con el consentimiento informado de padres y representantes de los participantes, y por el Comité de Bioética del Hospital, Maternidad Concepción Palacios. El reclutamiento de los niños para participar en el estudio se realizó de manera consecutiva. Un grupo problema de 41 niños con TEA provenientes de la Unidad de Autismo de la Maternidad Concepción Palacios, Caracas-Venezuela con edades comprendidas entre 3-14 años. Un grupo control de 35 niños normotípicos, provenientes del Colegio Patria de Bolívar de la misma ciudad, con edades entre 2 y 13 años. No hubo selección de género en ambos grupos. Los criterios de inclusión establecidos para el grupo problema fueron: no estar recibiendo antimicrobianos, probióticos, cualquier otro fármaco, ninguna dieta libre de gluten y caseína y con diagnóstico de autismo. El grupo control se utilizó para evaluar la MI, presencia de disbiosis y síntomas gastrointestinales. A los padres se les explicó la forma correcta para la recolección de la muestra de heces, conservación y transporte en medios microbiológicos: Stuart o Amies y Cary-Blair, los cuales contienen nutrientes específicos, de bajo potencial oxidoreducción y un pH adecuado para la recuperación de microorganismos (8-9). Se elaboró un cuestionario para recolectar la información proveniente de las historias médicas, observaciones del médico responsable de la unidad y los padres; registrándose edad, sexo, síntomas gastrointestinales y conductas del neurodesarrollo. Para el procesamiento de las muestras en el laboratorio se emplearon medios de cultivo selectivos y diferenciales: Levine (Oxoid), MacConkey (Oxoid), SS agar (Oxoid), XLD (Oxoid), TCBS (Oxoid), Campylobacter libre de sangre (con suplemento CAT-Oxoid) para el crecimiento de las bacterias enteropatógenas, benéficas y transitorias Gram negativas. CNA (Agar sangre con suplemento CNA-Oxoid) para las bacterias benéficas y transitorias Gram positivas. Para la recuperación de hongos levaduriformes y filamentosos se emplearon medios de Sabouraud Dextrosa Agar+Gentamicina, Chromo Agar (Oxoid) y Mycosel Agar (BBL). El medio de Levine, CNA y Sabouraud+Gentamicina fueron los medios básicos para extraer, identificar

e interpretar la MGIA benéfica y transitoria Gram negativa, Gram positiva y hongos respectivamente, los medios restantes fueron para identificar la MGIA enteropatógena. Para la semicuantificación de los microorganismos de la MGIA, se utilizó un gramo de heces correspondiente a unidades formadoras de colonia/gramo de heces (UFC/gH). Las muestras de heces se sembraron en base a cuatro cuadrantes, para su posterior lectura e interpretación. La MGIA en estudio se identificaron por pruebas bioquímicas convencionales, prueba de filamentización en suero, equipo automatizado (VITEK® 2 Compact) y pruebas de aglutinación.

La identificación de la MGIA fue evaluada en base al crecimiento de microorganismos beneficiosos, transitorios y/o presencia de enteropatógenos aeróbicos, utilizando como indicador de microbiota beneficiosa a *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) los cuales siempre deben estar en mayor cantidad que los demás, en una proporción de 3 a 4 (+) cruces de crecimiento en placa. Mientras que la microbiota transitoria como *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Candida spp.*, entre otros, deberían encontrarse ausentes o hasta 1 (+).

Cada cruz corresponde a un cuadrante de siembra cuya escala se representa de la siguiente manera: 1(+): Crecimiento escaso (<103) UFC/gH; 2(+): Crecimiento leve (103-104) UFC/gH; 3(+): Crecimiento moderado (105-106) UFC/gH y 4(+): Crecimiento abundante (>107) UFC/gH (10 - 12).

La interpretación de los grados de disbiosis se realizó de la siguiente manera:

**Disbiosis grado I:** microbiota gastrointestinal transitoria con crecimiento hasta el segundo cuadrante (2+).

**Disbiosis grado II:** microbiota gastrointestinal transitoria con crecimiento hasta el tercer cuadrante (3+).

**Disbiosis grado III:** microbiota gastrointestinal transitoria con crecimiento hasta el cuarto cuadrante (4+).

**Ausencia de disbiosis:** microbiota gastrointestinal transitoria ausente o con crecimiento en el primer cuadrante el cual es considerado normal para estos gérmenes 1(+) (10).

Para el análisis estadístico de esta investigación se

utilizó el programa SPSS versión 20 para Windows, se aplicó Chi-cuadrado, Test exacto de Fisher de dos colas y porcentajes a los datos recolectados. Para la comparación de la MGIA más aislada se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. El intervalo de confianza fue de un 95% con una significancia de  $p < 0.05$ .

## Resultados

La población con TEA fue de 41 niños, en edades comprendidas entre 3 y 13 años ( $6,8 \pm 2,9$ ); 30 (73%) masculino y 11 (27%) femenino. Los 35 niños que conformaron el grupo control, las edades estuvieron entre 2 y 11 años ( $7,1 \pm 2,4$ ); 17 (49%) masculino y 18 (51%) femenino. Los resultados sobre los grados de disbiosis en el grupo problema fueron: 5 (12.2 %) grado I; 8 (19.5 %) grado II; 20 (48.8 %) grado III y 8 (19.5 %) ausencia de disbiosis. Mientras que la presencia de disbiosis en el grupo control fue: 3 (8.6 %) grado I; 1 (2.9 %) grado II; 8 (22.8%) grado III y 23 (65.7 %) ausencia de disbiosis. El grupo control a pesar de ser niños normotípicos (sin problemas neurológicos o enfermedad conocida) hubo presencia de disbiosis pasajera en 12 niños (34.3%). Al comparar los grados de disbiosis entre los dos grupos hubo una significancia estadística de  $p=0.034$ .

Los microorganismos aislados como microbiota benéfica en niños con TEA y grupo control fueron *E. coli* y *E. faecalis*. Al comparar ambos grupos, se obtuvo  $p=0.689$  para *E. coli* y  $p=0.168$  para *E. faecalis*, Tabla 1. Los principales microorganismos de la microbiota transitoria involucrados en la producción de disbiosis en niños con TEA fueron: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) y *Serratia marcescens* (*S. marcescens*); con una significancia estadística de  $p=0.009$ ,  $0.006$  y  $0.037$  respectivamente, en relación al grupo control. Los demás microorganismos transitorios causantes o no de disbiosis se detallan en la Tabla 1. Al aplicar la prueba estadística de Kruskal-Wallis para determinar si existía diferencia entre *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *S. marcescens* como gérmenes transitorios mayormente aislados y los diferentes grados de disbiosis, se obtuvo  $p=0.017$ , expresando que el crecimiento de estos tres gérmenes es variable respecto a los grados de disbiosis. Se identificaron 2 aislados de *Campylobacter coli* (*C. coli*) como microbiota enteropatógena en 2 niños con TEA, mientras que en el grupo control no hubo aislamientos de este tipo.

Tabla 1. Microbiota aeróbica benéfica (*E. coli* y *E. faecalis*), transitoria (todas las demás investigadas diferentes a *E. coli* y *E. faecalis*), interpretación de acuerdo a su crecimiento en placa, porcentajes y significancia estadística en niños con TEA y Grupo Control.

Microorganismos aeróbicos benéficos	Interpretación	Pacientes TEA	Grupo Control	p
<i>Escherichia coli</i>	Normal	36(87,8%)	32(91,4%)	0,689
	Disminuido	2(4,9%)	2(5,7%)	
	Ausente	3(7,3%)	1(2,9%)	
<i>Enterococcus faecalis</i>	Normal	28(68,3%)	29(82,9%)	0,168
	Disminuido	10(24,4%)	6(17,1%)	
	Ausente	3(7,3%)	0(0,0%)	
Microorganismos aeróbicos transitorios				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ausente	27(65,8%)	33(94,3%)	0,009
	Normal	2(4,9%)	0(0,0%)	
	Aumentado	12(29,3%)	2(5,7%)	
<i>Proteus mirabilis</i>	Ausente	27(65,9%)	33(94,3%)	0,006
	Normal	6(14,6%)	2(5,7%)	
	Aumentado	8(19,5%)	0(0,0%)	
<i>Serratia marcescens</i>	Ausente	34(82,9%)	35(100%)	0,037
	Normal	2(4,9%)	0(0,0%)	
	Aumentado	5(12,2%)	0(0,0%)	
<i>Citrobacter freundii</i>	Ausente	38(92,7%)	30(85,7%)	0,270
	Normal	0(0,0%)	0(0,0%)	
	Aumentado	3(7,3%)	5(14,3%)	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ausente	39(95,1%)	35(100%)	0,288
	Normal	0(0,0%)	0(0,0%)	
	Aumentado	2(4,9%)	0(0,0%)	
<i>Klebsiella ozaenae</i>	Ausente	39(95,1%)	33(94,3%)	0,132
	Normal	0(0,0%)	2(5,7%)	
	Aumentado	2(4,9%)	0(0,0%)	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ausente	40(97,6%)	34(97,1%)	0,712
	Normal	0(0,0%)	0(0,0%)	
	Aumentado	1(2,4%)	1(2,9%)	
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	Ausente	39(95,1%)	34(97,1%)	0,560
	Normal	0(0,0%)	0(0,0%)	
	Aumentado	2(4,9%)	1(2,9%)	
<i>Serratia odorifera</i>	Ausente	40(97,6%)	35(100%)	0,539
	Normal	0(0,0%)	0(0,0%)	
	Aumentado	1(2,4%)	0(0,0%)	
<i>Enterobacter sakizakii</i>	Ausente	40(97,6%)	35(100%)	0,539
	Normal	0(0,0%)	0(0,0%)	
	Aumentado	1(2,4%)	0(0,0%)	
<i>Streptococcus spp.</i>	Ausente	32(78,0%)	32(91,4%)	0,281
	Normal	3(7,3%)	1(2,9%)	
	Aumentado	6(14,7%)	2(5,7%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	35(85,4%)	34(97,1%)	0,142
	Normal	4(9,8%)	0(0,0%)	
	Aumentado	2(4,9%)	1(2,9%)	
<i>Candida tropicalis</i>	Ausente	34(82,9%)	30(85,7%)	0,409
	Normal	5(12,2%)	5(14,3%)	
	Aumentado	2(4,9%)	0(0,0%)	
<i>Candida glabrata</i>	Ausente	39(95,1%)	35(100%)	0,416
	Normal	1(2,4%)	0(0,0%)	
	Aumentado	1(2,4%)	0(0,0%)	
<i>Candida krusei</i>	Ausente	40(97,6%)	33(94,3%)	0,200
	Normal	0(0,0%)	2(5,7%)	
	Aumentado	1(2,4%)	0(0,0%)	

Test Exacto de Fisher, Frecuencias menores a 5 por microorganismo.

*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*: normal de 3 a 4 (+), disminuido: de 2 a 1 (+), Ausente: ningún crecimiento detectado por el método. Otras enterobacterias diferentes a *Escherichia coli*: normal hasta 1(+), aumentado de 2 a 4 (+). Cocos Gram positivos diferentes a *Enterococcus faecalis*, especies de *Candida* y levaduras: normal hasta 1 (+), aumentado de 2 a 4 (+). TEA: trastorno del espectro autista.

Los síntomas gastrointestinales persistentes evaluados en los niños con TEA fueron: dolor abdominal 14 (34,2%), diarrea 9 (22%) y estreñimiento 14 (34,2%); y en el grupo control: dolor abdominal

7 (20%), diarrea 5 (14.3%) y estreñimiento 5 (14.3%). En el grupo control se encontraron 17 niños (48.6%) con síntomas gastrointestinales transitorios. De los síntomas intestinales evaluados solo el estreñimiento tuvo significancia estadística de  $p= 0.041$  respecto al grupo control. No hubo significancia estadística al comparar el estreñimiento como síntoma gastrointestinal más

relevante en niños con TEA respecto a las conductas del neurodesarrollo, ver Tabla 2. La comparación de los síntomas gastrointestinales con el grado de disbiosis no fue estadísticamente significativa, ver Tabla 3.

Las conductas del neurodesarrollo evaluadas en los niños con TEA fueron: aleteos con un 48,8%, autoagresión 34,1%, berrinches 63,4%, insomnio 36,6% y capacidad verbal 73,2%. Al comparar estas alteraciones conductuales con el grado de disbiosis no hubo significancia estadística, ver Tabla 4.

Tabla 2. Capacidad diagnóstica del estreñimiento como síntoma gastrointestinal relevante en las alteraciones de las conductas del neurodesarrollo en niños con trastorno del espectro autista.

Conductas del neurodesarrollo		Interpretación		S	E	VPP	VPN	p
Aleteo		Presencia (20)	Ausencia (21)					
Estreñimiento	Presencia (14)	8	6	57,1%	55,5%	42,8%	44,4%	0.659
	Ausencia (27)	12	15					
Autoagresión		Presencia (14)	Ausencia (27)					
Estreñimiento	Presencia (14)	6	8	42,8%	70,3%	57,1%	29,6%	0.617
	Ausencia (27)	8	19					
Berrinches continuos		Presencia (26)	Ausencia (15)					
Estreñimiento	Presencia (14)	9	5	64,3%	37,0%	35,7%	62,9%	0.934
	Ausencia (27)	17	10					
Insomnio		Presencia (15)	Ausencia (26)					
Estreñimiento	Presencia (14)	7	7	50%	70,4%	50%	29,6%	0.346
	Ausencia (27)	8	19					
Capacidad verbal		Presencia (30)	Ausencia(11)					
Estreñimiento	Presencia (14)	10	4	71,4%	25,9%	28,6%	74,0%	0.856
	Ausencia (27)	20	7					

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo. Los valores en paréntesis denotan la cantidad (n) de la población estudiada. p: significancia estadística. Test Exacto de Fisher, Frecuencias menores a 5 por alteración.

Tabla 3. Síntomas gastrointestinales en niños con Trastornos del espectro autista respecto a la Disbiosis.

Síntomas gastrointestinales		Interpretación		S	E	VPP	VPN	p
Dolor abdominal		Presencia (8)	Ausencia (33)					
Disbiosis	Presencia (33)	7	26	87,5%	21,2%	21,2%	87,5%	0.952
	Ausencia (8)	1	7					
Diarrea		Presencia (15)	Ausencia (26)					
Disbiosis	Presencia (33)	12	21	80,0%	19,2%	36,4%	62,5%	0.952
	Ausencia (8)	3	5					
Estreñimiento		Presencia (14)	Ausencia (27)					
Disbiosis	Presencia (33)	13	20	92,9%	25,9%	39,4%	87,5%	0.306
	Ausencia (8)	1	7					

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo. Los valores en paréntesis denotan la cantidad (n) de la población estudiada. p: significancia estadística. Test Exacto de Fisher, Frecuencias menores a 5 por alteración.

Tabla 4. Alteraciones de las conductas del neurodesarrollo en niños con Trastorno del espectro autista respecto a la Disbiosis

Conductas del neurodesarrollo		Interpretación		S	E	VPP	VPN	p
Disbiosis	Aleteo	Presencia (20)	Ausencia (21)					
	Presencia (33)	18	15	90%	28,5%	10%	71,4%	0.133
	Ausencia (8)	2	6					
Disbiosis	Autoagresión	Presencia (14)	Ausencia (27)					
	Presencia (33)	11	22	78.5%	18,5%	21,4%	81,4%	0.823
	Ausencia (8)	3	5					
Disbiosis	Berrinches	Presencia (26)	Ausencia (15)					
	Presencia (33)	20	13	76.9%	13,3%	23,0%	86,7%	0.448
	Ausencia (8)	6	2					
Disbiosis	Insomnio	Presencia (15)	Ausencia (26)					
	Presencia (33)	12	21	80%	19,2%	20%	80,7%	0.952
	Ausencia (8)	3	5					
Disbiosis	Capacidad verbal	Presencia (30)	Ausencia(11)					
	Presencia (33)	24	9	80%	18,2%	20%	81,2%	0.896
	Ausencia (8)	6	2					

S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo. Los valores en paréntesis denotan la cantidad (n) de la población estudiada. p: significancia estadística. Test Exacto de Fisher, Frecuencias menores a 5 por alteración.

### Discusión y conclusiones

La presencia de disbiosis causando alteración en el sistema intestinal se ha asociado con mayor frecuencia en niños con TEA. En la mayoría de estudios poblacionales con condición del TEA, el género masculino prevalece sobre el femenino, resultados que concuerdan con esta investigación (13-14). Para evaluar la investigación de disbiosis se tomó como referencia la metodología de estudios previos hechos en pacientes pediátricos con TEA y Diabetes (12-15), adaptándola al método científico y microbiológico estandarizado por Moreno *et al.*, (10). El estudio de disbiosis por cultivo se presenta como una herramienta útil en la investigación del desequilibrio de la MI en niños con TEA en nuestro país, ante la ausencia de técnicas de secuenciación molecular, a veces inaccesibles a los laboratorios de microbiología y a los pacientes por los altos costos que implica este tipo de metodología avanzada.

Los microorganismos que constituyen el ecosistema de la MI, se concentran en dos grandes grupos: los que cohabitan como colonizantes y contribuyen en las funciones benéficas, regulatorias y protectoras del sistema digestivo y, el grupo de microorganismos transitorios provenientes de la ingesta diaria de alimentos, quienes aportan los nutrientes necesarios

para la absorción y síntesis de vitaminas y minerales, entre otros (15). El presente estudio se caracterizó por evaluar la alteración de la MGIA. Este tipo de microorganismos constituyen casi el 20% de la microbiota intestinal (6, 10, 13-20). Existen pocos estudios sobre la evaluación de esta parte de la MI en niños con TEA que presentan trastornos gastrointestinales y neuroconductuales.

Filogenéticamente el microbioma humano está dominado por dos filos: *Firmicutes* y *Bacteroidetes* encontrándose en un 75% y 20% respectivamente, con contribuciones menores de los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (1). Las enterobacterias pertenecen al filo Proteobacterias, entre ellas tenemos especies de *E. coli* no patógenas que estimulan el sistema inmunológico, promueven la síntesis de defensinas, favoreciendo la nutrición de los enterocitos (1, 21-22). Los aislados de *E. coli* como microbiota benéfica en esta investigación no presentaron significancia estadística en las poblaciones estudiadas, resultados similares a los reportados por Adams *et al.*, (12) y Gondalia *et al.*, (13). Otras enterobacterias como especies de *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Morganella*, *Pseudomonas*, entre otras, son clasificadas como microbiota transitoria, sintetizan sustancias tóxicas contra bacterias enteropatógenas, debiendo conservar un crecimiento de <10<sup>3</sup>, para poder mantener la simbiosis en el TGI (11). En este estudio de acuerdo a los criterios establecidos por

Moreno y col., (10), *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *S. marcescens*, fueron causantes de disbiosis, resultados que difieren a los encontrados por Adams *et al.*, (12); pero concordantes con los obtenidos por Garret *et al.*, donde fueron observados con más frecuencia en heces de pacientes con colitis ulcerosa que en controles sanos (22).

*E. faecalis* pertenece al filo *Firmicutes*, como microbiota benéfica favorece la protección de la mucosa intestinal viéndose involucrado en la síntesis de IgA (10). En este estudio no hubo diferencia significativa en cuanto al crecimiento de este microorganismo en los grupos ensayados. Otros microorganismos encontrados en esta investigación pertenecientes al filo *Firmicutes* y como microbiota transitoria fueron: *S. aureus* y *Streptococcus*  $\alpha$  hemolítico, resultados similares a los encontrados por Adams *et al.*, (12), y Gondalia *et al.*, (13).

La campylobacteriosis es el cuarto microorganismo causante de enfermedades diarreicas a nivel mundial (26), en la presente investigación 2 (4.9%) niños con TEA presentaron disbiosis por este microorganismo.

El género *Candida* pertenece al filo *Ascomycota*, es considerada como microbiota normal a nivel intestinal, y no supera 103 UFC/gH (10, 11, 23). La alteración del sistema intestinal favorece su sobrecrecimiento; pero especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterias* y algunas especies de *Bacteroides* actúan como agentes reguladores, produciendo ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas para su control (24). Este estudio evidenció disbiosis por *Candida* en 4 niños con TEA, datos diferentes a los obtenidos por Emam *et al.*, (25), donde *Candida albicans* causó disbiosis en 68 (81,9%) niños con TEA.

Los síntomas intestinales observados en niños con TEA en este estudio coinciden con otras investigaciones (27-29). En esta investigación el estreñimiento fue el síntoma intestinal más relevante ( $p=0.041$ ) en niños con TEA frente al grupo control, resultado similar al reportado por Ibraim *et al.*, (33), donde el estreñimiento en el grupo TEA y el grupo control fue de 33.9% vs 17.6% ( $p=0.003$ ) (29). Un estudio realizado en los Estados Unidos en 137 niños con TEA, el síntoma más común fue la diarrea con 17% (30), mientras que en la presente investigación 9/41 (22%) niños con TEA presentaron esta sintomatología, resultado que pudo verse influenciado por el número de pacientes estudiados. Un estudio de metanálisis de la revista *The American Academy of Pediatrics* (28), revisó 15 publicaciones para un total de 2215 niños con TEA,

refieren que la diarrea se presentó en 80%, seguido del estreñimiento 60% y dolor abdominal 53%. Un estudio venezolano evaluó 45 niños con TEA, y el vómito fue el síntoma predominante con 55,5% (14), resultados que difieren con los del presente estudio. Otras investigaciones similares empleando el mismo método de determinación en cuanto a los síntomas intestinales reportaron mayor estreñimiento en pacientes con TEA respecto al grupo control, concluyendo que la alta incidencia de estreñimiento en niños con TEA, pudiera deberse al control de esfínteres, selectividad alimentaria, ciertos medicamentos, como también una inmunopatología de la mucosa inducida por antígenos liberados por las células TH2 y eosinófilos, afectando la función neuronal de las células del intestino produciendo dismotilidad (27-28).

El estreñimiento fue el síntoma gastrointestinal con mayor relevancia en este estudio, pero al relacionarlo con las alteraciones neuroconductuales y con la presencia de disbiosis no se evidencio como síntoma diagnóstico predictor de estas conductas, ni precursor de disbiosis, a pesar de encontrar valores de sensibilidad y valores predictivos negativos significantes, pero con valores de especificidad y valores predicativos positivos irrelevantes, refiriendo que estos síntomas y conductas no son los suficientemente contundentes para sugerir que son causa de la disbiosis. La capacidad verbal en la presente investigación con una sensibilidad del 71,4%, y un valor predictivo negativo del 74,0% respecto al estreñimiento no es una conducta específica para predecir que el estreñimiento sea causante de la presencia o ausencia del lenguaje, a pesar de que el estreñimiento es causante de incomodidad y comportamientos atípicos en estos pacientes (31).

Una de las limitantes presentes en esta investigación fue el control grupo, donde hubo presencia de disbiosis y síntomas gastrointestinales temporales, por lo que se sugiere continuar con el estudio con una mejor selección del grupo control para poder obtener verdaderos negativos, que nos permitan decir si estos síntomas intestinales y conductuales son producto de la disbiosis o de la condición propiamente dicha del TEA, así como también aumentar el número del grupo en estudio.

Este trabajo de investigación concluye que la disbiosis se presenta con mayor frecuencia en niños con TEA, al igual que el estreñimiento como síntoma gastrointestinal. Los microorganismos que componen la MGIA causantes de disbiosis con mayor periodicidad y sobrecrecimiento

fueron: *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *S. marcescens*. Se requieren estudios más controlados para poder relacionar la disbiosis como causante de alteraciones intestinales y conductuales.

### Agradecimientos

El proyecto fue financiado parcialmente por el consejo de desarrollo científico y humanístico (CDCH), de la Universidad Central de Venezuela (UCV), bajo el Proyecto de grupo N°PG-09-8820-2013/1 y el Departamento de Microbiología del Instituto Médico la Floresta. A los padres o representantes de los niños incluidos en el estudio y a los Lic. Carolina Macero y Gustavo Martínez.

### Referencias

1. Wasilewska J, Klukowski M. Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks – a possible new overlap syndrome. *Ped Health, Medic and Therapeutics* 2015;6:153–166.
2. American Psychiatric Association DSM-5. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Editorial Médica Panamericana; 2014.
3. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years-Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 sites, United States, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2014; 63(2):1-22.
4. Dupont A, Dupont H. The Intestinal Microbiota and Chronic Disorder of the Gut. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2011; 8(9):523-31.
5. Icaza-Chávez M. E. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev Gastroenterol de Mex* 2013; 78(4):240-48.
6. Gómez M, Acero F. Composición y Funciones de la Flora Bacteriana Intestinal. *Repertorio de Medicina y Cirugía* 2011; 20(2):74-82.
7. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 2015; 0:1–10.
8. Koneman E, Allen S, Janda W, et al. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color. 5ta ed. Editorial Médica Panamericana. España; 2004. p. 74-79.
9. Murray P. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC; 2003. p. 120-150.
10. Moreno X, Santamaria G, Sánchez R, et al. Microbiota Gastrointestinal aeróbica en niños con trastorno del espectro autista. Estudio preliminar. *Rev Gen* 2015; 69(2):36-44.
11. Soyucen E, Gulcan A, Cigdem A, et al. Differences in the gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes. *Pediatrics International* 2014; 56: 336-43.
12. Adams A, Johansen L, Powell L, et al. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism-comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterology* 2011; 11(22):1333-41.
13. Gondalia SV, Palombo EA, Knowles SR, et al. Molecular Characterisation of Gastrointestinal Microbiota of children with autism (with and without gastrointestinal dysfunction) and their neurotypical siblings. *Autism Research* 2012; p. 419-27.
14. González L, López K, Navarro D, et al. Características endoscópicas, histológicas e inmunológicas de la mucosa digestiva en niños autistas con síntomas gastrointestinales. *Arch Venezol de Puericult y Ped* 2006; 69(1):19-25.
15. Parracho HM, Bingham MO, Gibson GR, et al. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol* 2005; 54:987–91.
16. Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y la enfermedad. *Nutr Hosp* 2007; 22(2):14-19.
17. Chow J, Tang H, Mazmanian S. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol* 2011; 23(4): 473-80.
18. Garret W, Gallini C, Yatsunenko T, et al. Enterobacteriaceae act in cert with the gut microbioma to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cells Host Microbe* 2010; 8(3): 292-300.
19. Sonoyama K, Miki A, Sugita R. Gut colonization by *Candida albicans* aggravates inflammation in the gut and extra-gut tissues in mice. *Med Mycol* 2011; 49:237-47.
20. Bernhard H, Wellmer A, Zimmerman K, et al. Growth of *Candida albicans* in normal and altered faecal flora in the model of continuous flow culture. *Mycoses* 1995; 38:265-70.
21. Emam M, Mamdouh E, Abdelrahim S. *Candida albicans* Infection in Autism. *J Am Sci* 2012; 8(12):739-744.
22. *Campylobacter*. Organización mundial de la salud. [Internet] [consultada 28.07.18]. Tomado de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
23. McElhanon B, McCracken C, Karpen S, et al. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A Meta-analysis. *Pediatric* 2014; 133(5):872-83.
24. Chaidez V, Hansen R. Gastrointestinal problems in children with autism. Developmental delays or typical developmental. *J Autism Dev Disord* 2014; 5(44): 1117-27.
25. Ibrahim S, Voigt R, Katusic S, et al. Incidence of gastrointestinal symptoms in children: A population-based study. *Pediatric* 2009; 124(2):680-86.
26. Molloy S, Manning-Courthey P. Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and autistic spectrum disorders. *Autism* 2003; 7(2): 165-71.
27. Coury D.L, Ashwood P, Fasano A, et al. Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. *Pediatrics* 2012; 130(2): S160-S68.